

Aus der II. Medizinischen Klinik für Innere Medizin
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. M. Kneba)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel,
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**ENTWICKLUNG UND EVALUATION STANDARDISIERTER
DURCHFLUSSZYTOMETRISCHER METHODEN ZUR BESTIMMUNG
DER MINIMALEN RESTERKRANKUNG BEI
MANTELZELLYMPHOMEN UND BEI DER CHRONISCHEN
LYMPHATISCHEN LEUKÄMIE DER B-ZELLREIHE**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Sebastian Buske
aus
Rendsburg

Kiel 2014

Referent: *Frau Prof. Dr. Monika Brüggemann, Klinik für Innere Medizin II mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie*

Ko-Referent: *Herr Prof. Dr. R. Siebert, Institut für Humangenetik*

Tag der mündlichen Prüfung: *01.12.2014*

Zum Druck genehmigt: *Kiel, den 01.12.2014*

gez.: *Herr Prof. Dr. Johann Roider*

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Abkürzungsverzeichnis:

APC	Allophycocyanin
ASO	Allele Specific Oligonukleotide; Allel-spezifisches Oligonukleotid
BD	Becton Dickinson
BMND	Bone Marrow Normal Donor; Knochenmark gesunder Spender
BSA	Bovine Serum Albumine, Rinderserumalbumin
CD	Cluster of differentiation
CDR	Complementarity Determining Region; Region des Immunglobulin-Schwerkettengens, das die Komplementarität zum Antigen bestimmt
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
CR	Complete Remission; komplette Remission
C _T	Threshold Cycle
DCLLSG	Deutsche CLL Studiengruppe
DNA	Deoxyribonucleic Acid; Desoxyribonukleinsäure (DNS)
dNTP	Desoxy-Nucleosid-Triphosphate
ddNTP	Didesoxy-Nucleosid-Triphosphate
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting; Durchflusszytometrie
Fc-Rezeptor	Membranrezeptor mit Bindungsspezifität zu einem Teil eines Antikörpers welches Fragment Fc (engl. crystallisable fragment) genannt wird
FC	Fludarabin/Cyclophosphamid
FISH	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter, Vorwärtsstreulicht
FR1	Framework Region 1, Rahmenregion 1; Region innerhalb des Schwerkettengens mit geringer Variabilität
HSZT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
IGH	Immunoglobulin Gene Heavy Chain; Immunglobulinschwerkettengens
KM	Knochenmark
LDH	Laktatdehydrogenase
LKR	Leichtkettenrestriktion
MCL	Mantle Cell Lymphoma; Mantelzelllymphom
MDD	Minimal disseminated disease

MFIR	Mean Fluorescence Intensity Ratio; Signal-Rausch-Verhältnisse des geometrischen Mittelwerts
MRD	Minimal Residual Disease; minimale Resterkrankung
NCI	National Cancer Institute
ND	Normal Donor; gesunder Spender
NK	Natürliche Killerzellen
ORR	Overall Response Rate; Gesamtansprechrates
OS	Overall Survival; Gesamtüberleben
PB	Peripheral Blood; peripheres Blut
PBND	Peripheral Blood Normal Donor; peripheres Blut gesunder Spender
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction; Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP -Cy5.5	Peridinin Chlorophyll Protein Cyanine 5.5
PFÜ	Progressionsfreies Überleben
R-CHOP	Rituximab-Cyclophosphamid/Doxorubicin/Vincristin/Prednison
R-DHAP	Rituximab-Dexamethason/Cytarabin/Cisplatin
R-FC	Rituximab-Fludarabin/Cyclophosphamid
RQ	Real Time Quantitative-PCR; quantitative Echtzeit-PCR
SRV	Signal-Rausch-Verhältnis
SSC	Side Scatter; Seitwärtsstreulicht
V _H	Variable Gene for Heavy Chain; Teil des Schwerekettengens
D _H	Diversity Gene for Heavy Chain; Teil des Schwerekettengens
J _H	Joining Gene for Heavy Chain; Teil des Schwerekettengens
WHO	World Health Organization; Weltgesundheitsorganisation

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Patienten, Material und Methodik.....	6
2.1 Patientenproben und Proben gesunder Spender.....	6
2.1.1 MCL-Patientenkollektive.....	6
2.1.2 CLL-Patientenkollektive.....	8
2.1.3 Proben gesunder Spender.....	8
2.2 Durchflusszytometrische Analysen.....	9
2.2.1 Färbeprotokoll.....	9
2.2.2 Titration der Antikörper und Auswahl geeigneter Antikörper-Fluorochrom- Kombinationen.....	9
2.2.3 Finale Färbeansätze MCL und CLL.....	11
2.2.4 Durchflusszytometrische Messung	12
2.2.5 Auswertungsstrategie	13
2.2.5.1 Identifikation CD5 ⁺ CD19 ⁺ doppelt positiver Lymphozyten.....	13
2.2.5.2 Standardisierte Untersuchung der Expressionsstärken von Antigenen auf MCL- und CLL-Zellen und auf benignen CD5 ⁺ CD19 ⁺ -B-Lymphozyten	15
2.2.5.3 Auswertevorlagen für die objektive Auswertung von Expressionsstärke- Unterschieden zwischen malignen und benignen B-Zellen.	16
2.2.5.4 Analyse der Leichtkettenrestriktion	18
2.3 Molekulare Analysen	19
2.3.1 Qualitativer Klonalitätsnachweis mittels Konsensus-IGH-FR1-PCR und GeneScan- Analyse.....	19
2.3.2 Sequenzierung klonaler IGH-FR1-PCR-Produkte.....	21
2.3.3 ASO-IGH-RQ-PCR	22
2.4 Statistische Analysen	25
3. Ergebnisse	26
3.1 Titrationsergebnisse und Optimierung der Antikörper-Fluorochrom-Auswahl	26
3.2 Etablierung der FACS-Panels	27
3.2.1 Expressionsstärkenanalyse aberrant exprimierter Antigene auf MCL-Zellen im Vergleich zu benignen B-Lymphozyten	27
3.2.2 Durchflusszytometrische Analysen zur CLL.....	32

3.2.2.1 Expressionsstärkenanalyse aberrant exprimierter Antigene auf CLL-Zellen im Vergleich zu benignen B-Lymphozyten	32
3.2.2.2 Anwendung der kreierten Auswertevorlagen anhand 30 zusätzlicher Blutproben unbehandelter CLL8-Patienten	36
3.3 Vergleich der durchflusszytometrischen, histomorphologischen und molekularen MRD/MDD-Analysen.....	36
3.3.1 Initialdiagnostischer Vergleich der durchflusszytometrischen mit denen der Konsensus-IGH-FR1-PCR-Analyse und der Knochenmarkhistologie beim MCL.....	36
3.3.2 Vergleich der durchflusszytometrischen MRD-Ergebnisse der MCL-Verlaufsproben mit denen der Konsensus-IGH-FR1-PCR	38
3.3.3 Vergleich der FACS-MRD-Ergebnisse zwischen Knochenmarkproben und entsprechender Proben aus dem peripheren Blut bei MCL-Patienten	38
3.3.4 Vergleichende Verlaufsanalysen zwischen MRD-FACS und der IGH-RQ-PCR bei Patienten der CLL8-Studie.....	40
4. Diskussion.....	41
5. Zusammenfassung.....	47
6. Literaturverzeichnis	49
7. Danksagung.....	54
8. Lebenslauf.....	55

1. Einleitung

Das Mantelzelllymphom (MCL) ist eine seltene Neoplasie reifzelliger B-Lymphozyten mit einer Inzidenz von 2 pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Die Erkrankung wurde lange zusammen mit der Chronischen Lymphatischen Leukämie klassifiziert und erst 1975 durch Professor Lennert et al. als eigenständige Entität erkannt [1]. Die Ätiologie der Erkrankung ist bisher unbekannt. Charakterisiert wird das MCL durch eine chromosomale Translokation t(11;14)(q13;q32). Diese führt zu einer Überexpression von Cyclin D1, einem Protein, welches eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus hat. Die Patienten befinden sich zum Diagnosezeitpunkt zu 95% in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung (Ann Arbor Stadium III-IV). Das mediane Erkrankungsalter der Patienten liegt bei 63 Jahren, bei einem Verhältnis von 3:1 zwischen Männern und Frauen. Durchflusszytometrische Marker sind die oberflächliche Expression von CD19, CD20, CD22 bei gleichzeitiger CD5-Positivität und CD23-Negativität [2, 3].

Durch schnelle Resistenzentwicklungen gegen zytostatische Chemotherapeutika, hat das MCL eine deutliche schlechtere Prognose als andere periphere B-Zell-Lymphome. Die mediane Gesamtüberlebenszeit beträgt 2 - 5 Jahre, mit nur 10-15% Langzeitüberlebenden. Erst durch die Einführung des monoklonalen therapeutischen Antikörpers Rituximab (anti-CD20) und der myeloablativen Radiochemotherapie mit anschließender autologer Knochenmark-Stammzelltransplantation konnten die medianen Überlebenszeiten zuletzt auf 5-6 Jahre erhöht werden [4-6].

Die Chronische Lymphatische Leukämie (CLL) ist mit einer Inzidenz von 3 pro 100.000 Einwohner die häufigste Leukämieform in den westlichen Industrienationen. Die Erkrankung gehört nach der aktuellen WHO-Klassifikation von 2008 zu den peripheren Non-Hodgkin-Lymphomen der B-Zell-Reihe [2]. Die Ätiologie der CLL ist bis heute ebenfalls ungeklärt. Eine familiäre Häufung und eine niedrigere Inzidenz in Asien lassen auf einen genetischen Hintergrund schließen [7, 8]. Das mediane Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose liegt bei 65 Jahren. Dabei erkranken Männer doppelt so häufig wie Frauen an dieser Leukämieform. Patienten überleben im Median 10 Jahre mit der Erkrankung. Die Diagnose wird anhand einer anhaltenden Lymphozytose im peripheren Blut (> 5000 B-Lymphozyten/ μl), dem Nachweis zytomorphologisch reifzelliger Lymphozyten und einer Oberflächenexpression von CD19, CD20, CD23 bei gleichzeitiger CD5-Positivität sowie der Expression von kappa oder lambda Immunglobulin-Leichtketten auf den Lymphozyten gesichert [9].

In den vergangenen 15 Jahren wurden entscheidende neue Erkenntnisse zur Biologie und zu klinischen Verläufen der CLL gewonnen. So gelten eine kurze Verdopplungszeit der Lymphozyten (< 12 Monate), eine erhöhte Serum-Thymidinkinase-Aktivität, die Expression des Oberflächenmoleküls CD38 auf den CLL-Zellen, die Expression des Moleküls ZAP-70, bestimmte genetische Aberrationen (11q- und 17p-Deletion) sowie das Fehlen von somatischen Hypermutationen der Immunglobulinschwerkettengene als Risikofaktoren für einen ungünstigen Verlauf der CLL [9-13].

Die Möglichkeiten zur Behandlung der CLL haben sich in den letzten Jahren deutlich verbessert. Der Einsatz von Purinanaloga (z.B. Fludarabin) und ihre Kombination mit Cyclophosphamid (FC) führten zu höheren Ansprechraten (Gesamtansprechrates (ORR) von 83% auf 94%, Komplette Remission (CR) von 7% auf 24%) [14]. Das Progressionsfreie Überleben (PFÜ) konnte durch den Einsatz monoklonaler therapeutischer Antikörper wie Rituximab (anti-CD20) oder Alemtuzumab (anti-CD52) weiter gesteigert werden (R-FC vs. FC, PFÜ 65% vs. 45% [9, 15-19]. Somit werden heute deutlich verbesserte Remissionsqualitäten erzielt. Die intensivere Therapie führt bei jüngeren Patienten auch zur Verbesserung des progressionsfreien und des Gesamtüberlebens [16]. Trotzdem ist nur mit der Transplantation allogener hämatopoetischer Stammzellen (HSZT) eine kurative Behandlungsmöglichkeit für diese Krankheit gegeben [20-22]. Bis heute kann weder mit einer (Immun)-Chemotherapie noch mit der autologen HSZT der CLL-Klon komplett eliminiert werden.

Ausgangspunkt eines klinischen Rezidivs sind persistierende Tumorzellen unterhalb der Nachweisgrenze der Morphologie, die sogenannte minimale Resterkrankung (minimal residual disease, MRD).

Bei peripheren Non-Hodgkin-Lymphomen der B-Zell-Reihe kommen derzeit drei unterschiedliche Methoden zur MRD-Bestimmung zur Anwendung:

1. Konsensus-PCR zum Nachweis klonal rearrangierter Immunglobulinschwerkettengene (Konsensus-IGH-FR1-PCR),
2. Quantitative Real-Time-PCR (RQ-PCR) unter Verwendung von klonspezifischen Primern gegen die individuelle hypervariable Region des Schwerkettengens (ASO-IGH-RQ-PCR),
3. Mehrfarbendurchflusszytometrie.

Die erwähnten molekularen Methoden nutzen das Prinzip des genomischen Rearrangements des IGH-Lokus, das während der B-Zell-Entwicklung stattfindet und zur Bildung spezifischer DNA-Abschnitte im Bereich der hypervariablen IGH CDR3-Region führt. Die so entstandenen hypervariablen Bereiche stellen bei B-Zell-Lymphomen klonspezifische Sequenzen dar, die als molekulare Lymphommarker eingesetzt werden können.

Eine relativ einfache und kostengünstige Methode stellt in diesem Zusammenhang die Konsensus-IGH-FR1-PCR dar, bei der Konsensus-Primer gegen konservierte Bereiche der V- und J-Segmente zu PCR-Produkten führen, die den hypervariablen CDR3-Bereich der Immungenumlagerung überspannen. Eine Fragmentanalyse der amplifizierten PCR-Produkte erlaubt die Unterscheidung polyklonaler und monoklonaler PCR-Produkte. Zur Fragmentanalyse wird in der Regel das GeneScan-Verfahren eingesetzt, bei der fluoreszenzmarkierte Primer die lasergestützte Detektion der so markierten PCR-Produkte ermöglichen. Diese Methode liefert allerdings lediglich qualitative Ergebnisse mit einer Nachweisgrenze von 1-5% [23-25].

Im Gegensatz dazu stellt die ASO-IGH-RQ-PCR eine deutlich sensitivere und quantitative Methode zum MRD-Nachweis dar, erfordert allerdings die vorherige Sequenzierung der IGH-CDR3-Region sowie die Entwicklung klonspezifischer CDR3-Primer, die zusammen mit einer Fluoreszenzsonde und reversen Primern in die RQ-PCR eingesetzt werden [23]. Mit diesem labortechnisch aufwendigen Verfahren kann eine maligne Zelle unter 10^{-4} bis 10^{-5} gesunden Leukozyten erkannt werden [26-29].

Durchflusszytometrische Methoden zur MRD-Quantifizierung beruhen auf dem Nachweis von Zellen mit definierten Antigenexpressionsmustern [30-33]. Hierbei werden zunächst möglichst kleine Leukozytensubpopulationen identifiziert, die sowohl maligne als auch benigne Zellen einschließen. In diesen Leukozytensubpopulationen werden dann über unterschiedliche Expression weiterer Moleküle maligne von benignen Zellen unterschieden. Eines der ältesten Verfahren zur Unterscheidung maligner und benigner B-Lymphozyten ist die Analyse der Leichtkettenrestriktion (LKR). Hierbei werden B-Zell-Populationen auf die Expression von Immunglobulin-Leichtketten-Gruppen kappa (κ) und lambda (λ) untersucht. Im Falle von klonal expandierten B-Zellen tragen diese nur eine der beiden Leichtketten, sodass eine pathologische κ/λ -Ratio in definierten Subpopulationen nachgewiesen werden kann. Neben solchen qualitativen Expressionsunterschieden gewinnt auch die Analyse von unterschiedlichen Expressionsstärken definierter Antigene auf benignen und malignen Zellen zunehmende Bedeutung [23, 30, 34, 35]. Allerdings gibt es bis heute keine reproduzierbaren und allgemein akzeptierten Definitionen, die standardisiert die Über- oder Unterexpression

von Antigenen bei Erkrankten im Vergleich zu Gesunden beschreiben. Dieses Problem wird umso wichtiger, je geringer die Expressionsstärkenunterschiede sind, die zur Definition des malignen Immunphänotyps im Vergleich zu einer benignen Population herangezogen werden. Moderne durchflusszytometrische Methoden zur Bestimmung der MRD bei dem MCL und bei der CLL beruhen, wie auch bei allen anderen hämatologischen Neoplasien, auf der Identifikation von Zellen mit einem Immunphänotyp, der bei Gesunden nicht vorkommt [30-33].

Sowohl das MCL als auch die CLL exprimieren in der Regel CD5 auf ihrer Zelloberfläche. Methoden zum durchflusszytometrischen MRD-Nachweis bei beiden Entitäten verwenden Expressionsunterschiede weiterer Oberflächenantigene, um zwischen malignen und benignen CD5-positiven B-Lymphozyten unterscheiden zu können. CD5⁺ Zellen machen bei gesunden Probanden bis zu 43% aller B-Lymphozyten aus [36]. Sensitive Untersuchungen von MRD erfordern daher eine sichere Abgrenzung von diesen Zellen, insbesondere da ihr Anteil nach intensiver (Immun)-Chemotherapie auf bis zu 90% aller B-Lymphozyten ansteigen kann [37]. Die Unterexpression von CD20 trug bisher entscheidend zur Unterscheidung von CLL-Zellen von benignen CD5⁺-B-Lymphozyten bei [23, 35]. Problematisch in diesem Zusammenhang ist allerdings, dass der zunehmende Einsatz des therapeutischen monoklonalen anti-CD20 Antikörpers Rituximab zu einer langfristigen kompletten Blockade von CD20 auf der Zelloberfläche führt, so dass dieser Marker nicht mehr zum MRD-Nachweis verwendet werden kann. Die umfangreichen vergleichenden Protein-Expressionsanalysen von Rawstron et al. und de Tute zeigten, dass die Kombination CD81/CD22/CD19/CD5 eine spezifische Alternative zu den CD20-Kombinationen in der MRD-Diagnostik sein könnte [38, 39]. Deshalb wurde diese CD20 unabhängige Antikörper-Kombination (CD81/CD22/CD19/CD5) im Vierfarben-Ansatz für die CLL weiter untersucht.

Insgesamt bietet die Vielfarben-Durchflusszytometrie gegenüber sensitiven molekulargenetischen Verfahren wie der ASO-Primer-IGH-RQ-PCR einige praktische Vorteile. So können durchflusszytometrische Ergebnisse aus peripheren Blutproben wie auch aus Knochenmarkproben binnen eines Tages geliefert werden. Außerdem ist die Methode technisch einfacher anzuwenden.

Vergleichende Untersuchungen molekularer und durchflusszytometrischer MRD-Quantifizierungen insbesondere bei der CLL zeigen vergleichbare Ergebnisse zwischen ASO-IGH-RQ-PCR und 4-Farben-Durchflusszytometrie bis zu einer Sensitivität von 1×10^{-4} [23, 35].

Die MRD-Diagnostik ist heute ein wichtiger Bestandteil zur Effizienzbeurteilung von

verschiedenen Therapien in klinischen Studien [40-42].

Für die CLL zeigte Rawstron et al. erstmals die Bedeutung der 4-Farben-Durchflusszytometrie als sensitive Methode zur MRD-Quantifizierung [35]. Für diese Entität wird das Niveau der MRD bereits zur Anpassung der immunsuppressiven Therapie nach allogener HSZT der CLL verwendet [42]. Jüngst wurde für die CLL das Erreichen eines sehr niedrigen MRD-Niveaus mit einer Verbesserung des progressionsfreien Überlebens (PFÜ) und des Gesamtüberleben (OS) aufgezeigt [43-46].

Auch beim MCL erwiesen verschiedene Untersuchungen die Bedeutung der MRD als guten Indikator für das PFÜ nach verschiedenen Therapiestrategien [40, 41, 47]. Methode der ersten Wahl bei der Bestimmung der MRD ist derzeit die ASO-IGH-RQ-PCR. Durchflusszytometrische Quantifizierungen von Mantelzell-Lymphomzellen zum Diagnosezeitpunkt und im therapeutischen Verlauf wurden bis heute wenig durchgeführt [48, 49].

Eine weitere potentielle Anwendung von sensitiven Nachweismethoden einer minimalen Tumordinfiltration ist die initiale Ausbreitungsdiagnostik zum Nachweis einer minimalen disseminierten Erkrankung (minimal disseminated disease, MDD) bei Diagnose eines Lymphoms. So erlaubt die molekulargenetische bzw. durchflusszytometrische Analyse diagnostischer Knochenmark- oder Blutproben möglicherweise eine genauere Ausbreitungsdiagnostik, die gegebenenfalls zu einer therapielevanten Änderung des Stadiums der Erkrankung führt. Auch hier fehlen bisher standardisierte Analysen an größeren Patientenkollektiven [48].

Das Ziel der vorgelegten Arbeit war es, standardisierte und reproduzierbare Methoden zum sensitiven und spezifischen durchflusszytometrischen Nachweis von Tumorzellen beim MCL und der CLL zu entwickeln. Diese Methoden sollten auch für Patienten unter Rituximab-Therapie anwendbar sein. Grundlage der Entwicklung waren die bei Projektbeginn im Jahre 2004 bekannten immunphänotypischen Aberrationen der beiden Entitäten. Diese wurden systematisch im Vergleich zu gesunden Probanden analysiert. Zur Verbesserung der Auswertung der Messungen wurde eine Methode zur reproduzierbaren Detektion von Expressionstärkeunterschieden entwickelt und sowohl für MCL als auch für CLL-Proben angewandt. Diese Methode sollte außerdem durch Bezug auf einen internen Referenzstandard eine Unabhängigkeit vom eingesetzten Gerät sowie von dessen Einstellungen gewährleisten. Die Spezifität der Analysen sollte durch vergleichende Analysen von Proben gesunder Probanden überprüft werden, die Sensitivität durch einen Vergleich mit molekularbiologischen MRD-Techniken.

2. Patienten, Material und Methodik

2.1 Patientenproben und Proben gesunder Spender

2.1.1 MCL-Patientenkollektive

Zunächst wurden zur standardisierten Definition des aberranten MCL-Immunphänotyps 24 prätherapeutische Blutproben untersucht (Tab. 1.1, Kollektiv 1) und detaillierte Kennzahlen der Expressionsniveaus verschiedener Antigene bestimmt. Das Antigen CD81 wurde dabei nur bei 11 dieser 24 Proben untersucht, weil eine Zwischenanalyse die mangelnde Eignung dieses Antigens zur spezifischen Detektion von MCL-Zellen zeigte (siehe 3.2.1).

Die aus der Untersuchung von Kollektiv 1 hervorgegangenen Kennzahlen wurden an 75 Proben von 50 MCL-Patienten validiert (Tab. 1.1, Kollektiv 2).

Alle Proben stammen von Patienten, die im Rahmen der Studienprotokolle des europäischen Mantelzell-Lymphom-Netzwerks in unserem Labor untersucht wurden. Zudem wurden folgende Voraussetzungen festgelegt.

1. Die MCL-Infiltration des untersuchten Materials musste durchflusszytometrisch durch monoklonale LKR-Nachweis gesichert sein.
2. Die maligne Population musste CD5 positiv sein.
3. Eine (11;14) Translokation musste mittels FISH oder PCR bewiesen sein.

Tab. 1.1: Charakteristika der MCL-Kohorte zur Definition des aberranten Immunphänotyps

	Kollektiv 1	Kollektiv 2
Patientenzahl	24	50
Probenzahl	24	75
Geschlecht (m:w)	21:3	40:10
Medianes Alter (Spanne)	60 (39-75)	60 (39-80)
Blutproben: Knochenmarkaspirat	24:0	50:25
Prätherapeutisch : Induktionstherapie : Rezidiv : unklar	24:0:0:0	65:7:2:1

Nach Etablierung eines standardisierten FACS-Protokolls wurde damit im Weiteren Materialien von insgesamt 98 Patienten mit fortgeschrittenen Mantelzell-Lymphomen im Stadium II-IV, die im Rahmen der Studienprotokolle des europäischen Mantelzell-Lymphom-Netzwerks (European MCL Network, [6, 50]) behandelt wurden, untersucht (siehe Tabelle 1.2). Die Therapieprotokolle sahen für therapienaive Patienten unter 65 Jahren („MCL-Studie für Jüngere“) randomisiert entweder eine Behandlung mit sechs Zyklen R-CHOP oder mit jeweils drei alternierenden Zyklen R-CHOP und R-DHAP vor, jeweils gefolgt von

myeloablativer radiochemotherapeutischer Konditionierung und anschließender autologer HSZT. Patienten ab 65 Jahren („MCL-Studie für Ältere“) erhielten entweder 8 Zyklen R-CHOP oder 6 Zyklen R-FC, gefolgt von einer Erhaltungstherapie mit Interferon alpha oder Rituximab. Die Untersuchungszeitpunkte und Details zu den verschiedenen Studienprotokollen sind der Internetseite <http://www.lymphome.de/> zu entnehmen.

Insgesamt wurden innerhalb dieser Studie 281 Proben (198 Blutproben, 83 Knochenmarkaspirate) von 98 Patienten evaluiert. Von denen wurden bei Erstdiagnose (110 Proben von 84 Patienten) und im Therapieverlauf (171 Proben von 67 Patienten) untersucht. Von 53 Patienten lagen Proben von der Erstdiagnose und Verlaufsmaterialien vor, von 31 Patienten lagen nur Erstdiagnoseproben vor und von 14 Patienten nur Verlaufsmaterialien ohne Erstdiagnosematerial.

Tab. 1.2: Charakteristika des gesamten MCL-Patientenkollektivs

	Anzahl
Patientenzahl	98
Geschlecht (m:w)	22:76
Medianes Alter (Spanne)	62 (38-83)
Klinisches Stadium	
Stadium II	4 (4,1%)
Stadium III	15 (15,3%)
Stadium IV	79 (80,6%)
Histologisch gesicherte KM-Infiltration	73 (74,5%)
Magen-Darm-Befall	27 (27,6%)
Erhöhte LDH	30 (30,6%)
t(11;14) Nachweis durch FISH und/oder PCR	71 (72,4%)
Therapieprotokoll	
MCL-Studie für Jüngere	55 (56,1%)
MCL-Studie für Ältere	43 (43,9%)
Analysierte Pat. und Untersuchungszeitpunkte	
Nur Erstdiagnose (KM/PB-Proben)	84 (30/80)
MRD-Verlaufsmaterialien (KM/PB-Proben)	67 (53/118)

2.1.2 CLL-Patientenkollektive

Zur standardisierten Definition des aberranten Immunphänotyps der CLL wurden Blutproben von insgesamt 30 Patienten der CLL8-Studie untersucht (Tab. 2, Kollektiv 1). Bei der CLL8-Studie handelte es sich um eine Phase-III-Studie der Deutschen CLL Studiengruppe (DCLLSG), in der bei bisher unbehandelten Patienten eine kombinierte Immunchemotherapie (R-FC) gegen eine alleinige Chemotherapie (FC) verglichen wurde. Die Diagnose der CLL musste nach den Kriterien des National Cancer Institute (NCI)-Arbeitsgruppe gesichert sein [9]. Die Einschlusskriterien für die Studie und die klinischen Ergebnisse sind zwischenzeitlich publiziert worden [16].

Weiterhin wurden von 11 Patienten der CLL8-Studie, bei denen der Immunphänotyp aus der Analyse des primärdiagnostischen Materials bekannt war, insgesamt 67 Verlaufsmaterialien (Tab. 2, Kollektiv 2) unter FC-Therapie durchflusszytometrisch und mittels ASO-IGH-RQ-PCR auf minimale Resterkrankung untersucht (durchschnittlich 6 Probeneingänge pro Patient).

Tab. 2: Charakteristika der untersuchten CLL-Patientenkollektive

	Kollektiv 1	Kollektiv 2
Patientenzahl	30	11
Probenzahl	30	67
Geschlecht (m:w:unbekannt)	17:8:5	9:2:0
Medianes Alter (Spanne)	64 (35-77)	62 (52-84)
Blutproben: Knochenmarkaspirat	30:0	61:6
Primärdiagnostische Probe : Verlaufsmaterial	30:0	0:67

2.1.3 Proben gesunder Spender

Zusätzlich wurden 25 Blutproben gesunder Spender als Referenzkollektiv (m/w, 13/12, mit einem medianen Alter von 30 Jahren und einer Altersspanne von 21- 56 Jahren) und weitere 8 Knochenmarkproben, die im Rahmen der Routinediagnostik des Labors für Hämatologische Spezialdiagnostik der II. Medizinischen Klinik untersucht wurden, und bei denen kein Befall durch ein peripheres Non-Hodgkin-Lymphom der B-Zell-Reihe festgestellt werden konnte (5 weibliche und 3 männliche Patienten, medianes Alter 62, Alter zwischen 30- 70 Jahren), analysiert.

Der Antikörper CD20 FITC wurde vergleichend an 20 Proben gesunder Spender reevaluiert, die im Rahmen eines Vorläuferprojektes zur MRD bei der CLL untersucht worden waren [23].

2.2 Durchflusszytometrische Analysen

2.2.1 Färbeprotokoll

Das Blut oder Knochenmarkaspirat wurde in ein 50 ml Röhrchen (Sarstedt) überführt, auf 50ml mit einer PBS-Lösung (Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland), der 0,1% Natriumazid und 2%-iges fetales Kalbsserum zugesetzt waren, aufgefüllt und mindestens fünf Minuten vorsichtig geschwenkt. Diese Röhrchen wurden anschließend mit 500g (1600 Umdrehungen pro Minute) zehn Minuten lang zentrifugiert. Dadurch setzten sich die Leukozyten oberhalb der Erythrozyten ab, sodass der nichtkorpuskuläre Überstand der Probe abgesaugt werden konnte. Diese Prozedur wurde ein zweites Mal wiederholt. Am Ende des Waschvorganges wurde die Leukozytenzahl mittels eines Sysmex® Hamätologie-Messgerätes (Sysmex GmbH, Norderstedt, Deutschland) ermittelt. Die Leukozytenkonzentration in der Färbesuspension wurde auf 10000/µl eingestellt. Dies entspricht bei einem eingesetzten Volumen von 100 µl einer Million Leukozyten in der zu untersuchenden Probe. Waren die Proben zu zellreich an Leukozyten, musste die Zielkonzentration per Verdünnung mit der oben beschriebenen PBS-Lösung erreicht werden. Von dieser Zellsuspension wurden 100µl mit 25µl hitzeinaktiviertem Kaninchenserum (Sigma) 30 Minuten inkubiert, um die unspezifischen Fc-Membranrezeptoren zu blockieren. Zu diesen Zellproben wurden anschließend die verschiedenen Antikörper gegeben, vermischt und für weitere 15 Minuten in Dunkelheit inkubiert.

Nach der Inkubation mit den Antikörpern wurden die Erythrozyten mit 2 ml FACS Lysing Solution (BD) für 10 Minuten in Dunkelheit lysiert. Die Röhrchen wurden anschließend mit 500g 5 Minuten lang zentrifugiert, dekantiert und mit 4 ml PBS-Lösung (mit BSA) gewaschen. Nach weiteren 5 Minuten zentrifugieren wurden die Proben-Röhrchen erneut dekantiert und die Zellen mit 400µl PBS-Lösung im einfachen Ansatz resuspendiert.

2.2.2 Titration der Antikörper und Auswahl geeigneter Antikörper-Fluorochrom-Kombinationen

Die gewählten Antikörper wurden zunächst auf ihre Eignung, das entsprechende Antigen spezifisch zu detektieren, hin untersucht. Dazu wurden die Signal-Rausch-Verhältnisse (SRV)

der Antikörper mit unterschiedlichen Konjugaten auf benignen Lymphozyten und mit unterschiedlichen Antikörpermengen untersucht.

Blut gesunder Spender wurde nach der unter 2.2.1 beschriebenen Methode mit dem gewählten Antikörper gefärbt (jeweils in der vom Hersteller für 1 Millionen Zellen angegebenen Menge sowie zwei Verdünnungsstufen unterhalb der empfohlenen Menge und einer Stufe darüber). Von diesen vier Proben wurden jeweils 10.000 Leukozyten gemessen. Zur Errechnung der SRV wurden die gemessenen geometrischen Mittelwerte der für den Antikörper positiven Lymphozyten durch die geometrischen Mittelwerte der für den Antikörper negativen Lymphozyten geteilt.

Standen verschiedene Antigen-Fluorochrom-Kombinationen zur Verfügung, so wurde diejenige Kombination benutzt, die insgesamt das höchste SRV ergab.

Die untersuchten Antikörper sind in der nachfolgenden Tabelle 3 aufgeführt.

Tab. 3: Titrierte Antikörper, Fluorochrome, klonale Abstammung und deren Hersteller

Antigen	Fluorochrom	Klon	Hersteller
Isotypkontrolle	FITC	X40	BD
Isotypkontrolle	PE	MOPC-21	PharMingen(BD)
Isotypkontrolle	PerCP-Cy5.5	X40	BD
Isotypkontrolle	APC	X40	BD
kappa/lambda	FITC/PE	TB 28-2/1-155-2	Simultest® BD
CD3	APC	SK7	BD
CD4	PerCP-Cy5.5	SK3	BD
CD5	PE	UCHT2	PharMingen(BD)
	PerCP-Cy5.5	L17F12	BD
	APC	UCHT2	PharMingen(BD)
CD8	FITC	SK1	BD
CD19	PerCP-Cy5.5	SJ25C1	BD
	APC	SJ25C1	BD
CD20	FITC	L27	BD
	PE	L27	BD
CD22	PE	RFB4	Caltag
CD23	FITC	MHM6	Dako
CD43	PE	L10	Caltag
	APC	L10	Caltag
CD45	FITC	2D1	BD
CD56	PE	B159	PharMingen(BD)
CD79b	FITC	SN8	Caltag
CD81	FITC	JS-81	PharMingen(BD)

Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland (BD), Dako, Hamburg, Deutschland (Dako), Caltag, Hamburg, Deutschland (Caltag), Firma PharMingen von der Firma BD übernommen.

2.2.3 Finale Färbeansätze MCL und CLL

Die abschließend gewählten Färbeansätze sind in den folgenden Tabellen 4 (MCL), 5 (CLL) und 6 für gesunde Probanden aufgelistet. Details zu den verwendeten Antikörpern finden sich in Tabelle 3. Alle Antikörper wurden in titrierten Konzentrationen eingesetzt.

Tab. 4: Färbeansatz für Proben von MCL-Patienten

Röhrchen	FITC (µl)	PE (µl)	PerCP-Cy5.5 (µl)	APC (µl)
1	IgG1(10)	IgG1(5)	IgG1(2)	IgG1(5)
2	CD8(20)	-	-	-
3	-	CD5(5)	-	-
4	-	-	CD19(10)	-
5	-	-	-	CD3(1)
6	CD8(20)	CD56(5)	CD4(10)	CD3(1)
7	Simultest kappa/lambda(10)		CD5(15)	CD19(2)
8	CD79b(2)	CD22(5)	CD5(15)	CD19(2)
9	CD23(5)	CD22(5)	CD5(15)	CD19(2)

Tab. 5: Färbeansatz für CLL-Proben

Röhrchen	FITC (µl)	PE (µl)	PerCP-Cy5.5 (µl)	APC (µl)
1	IgG1(10)	IgG1(5)	IgG1(2)	IgG1(5)
2	CD8(20)	-	-	-
3	-	CD5(5)	-	-
4	-	-	CD4(10)	-
5	-	-	-	CD3(1)
6	CD8(20)	CD56(5)	CD4(10)	CD3(1)
7	Simultest kappa/lambda(10)		CD19(10)	CD5(10)
8	CD20(20)	CD5(10)	CD19(20)	CD43(10)
9	CD81(10)	CD22(10)	CD19(20)	CD5(20)
10	CD79b(4)	CD20(10)	CD19(20)	CD5(20)

Bei Verlaufsmaterialien wurden in den Probenröhrchen 8-10 die doppelte Zellzahl, d. h. 2 Mio. Leukozyten, gemessen und mit entsprechend verdoppelter Antikörpermenge gefärbt (grau = Röhrchen zur MRD-Messung).

Tab. 6: Färbeansatz für gesunde Probanden

Röhrchen	FITC (µl)	PE (µl)	PerCP-Cy5.5 (µl)	APC (µl)
1	IgG1(10)	IgG1(5)	IgG1(2)	IgG1(5)
2	CD45(5)	-	-	-
3	-	CD5(5)	-	-
4	-	-	CD4(10)	-
5	-	-	-	CD3(1)
6	CD23(5)	CD22(5)	CD5(15)	CD19(2)
7	CD79b(2)	CD22(5)	CD5(15)	CD19(2)
8	CD79b(4)	CD43(10)	CD19(20)	CD5(20)
9	CD81(10)	CD22(10)	CD19(20)	CD5(20)
10	CD79b(4)	CD20(10)	CD19(20)	CD5(20)

In den Probenröhrchen 8-10 wurde ebenfalls die doppelte Zellzahl gemessen, d. h. 2 Mio. Leukozyten, mit entsprechend verdoppelter Antikörpermengung gefärbt (grau = Röhrchen zur MRD-Messung).

Um die Sensitivität der MRD-Untersuchung bei CLL-Verlaufsproben zu erhöhen, wurde hier die Zellzahl im Ansatz verdoppelt (MRD-Ansatz), so dass 200µl der gewaschenen Zellsuspension mit 50 µl Kaninchenserum und der doppelten Menge Antikörper vermischt wurden. Dementsprechend waren 4 ml FACS Lysing Solution zur Lyse der Erythrozyten notwendig. Der MRD-Ansatz wurde mit 500µl PBS-Lösung resuspendiert.

2.2.4 Durchflusszytometrische Messung

Die gefärbten Proben wurden mit einem FACSCalibur (BD) und der CellQuest Pro v4.0.1 Software gemessen. Neben der täglichen Kalibrierung mit Calibrite Beads (BD) und der FACSComp v4.2 Software wurden anhand von Isotypkontrollen (Zellprobe inkubiert mit vier isotypidenten irrelevanten monoklonalen Antikörper FITC, PE, PerCP-Cy5.5, APC konjugiert, alle BD) bei jeder Probe die Vorwärtsstreulicht- (FSC) und Seitwärtsstreulichtparameter (SSC) angepasst und eingestellt, die Messgrenze (Threshold) auf den 52. Kanal gesetzt und die Spannung der Sekundärelektronenvervielfacher anhand der Lymphozyten optimiert. Diese Spannung wurde so gewählt, dass die Lymphozyten der individuellen Probe innerhalb der ersten Dekade für alle 4 Fluoreszenzkanäle dargestellt wurden. Die Kompensation wurde mit Hilfe der Kompensationskontrollen (jede war nur für einen einzelnen FITC, PE, PerCP-Cy5.5 oder APC positiven Antikörper gefärbt) vor jeder Messung und für jede Probe einzeln eingestellt. Zielkriterium war hier, dass der Median der Fluoreszenz der positiv gefärbten Lymphozyten in allen Kanälen, die nicht seinem

Hauptmesskanal entsprechen, dem Median der nichtgefärbten Lymphozytensubpopulation (d.h. der Isotypkontrolle) entspricht. Von der Isotypkontrolle, den Kompensationsröhrchen, der T-Lymphozyten-Differenzierung im Röhrchen 6 und der Leichtkettenbestimmung auf B-Lymphozyten im Röhrchen 7 wurden jeweils 10.000 Ereignisse gemessen. Für die MRD-Röhrchen (Röhrchen 8-10 des CLL-Panels) wurde eine verlängerte Messzeit eingestellt, um mehr residuelle maligne Zellen zu erfassen. Es wurden entweder zwei Millionen Ereignisse oder es wurde maximal 540 Sekunden gemessen. Die Röhrchen wurden mit der mittleren Durchflussgeschwindigkeit des FACSCalibur-Gerätes gemessen.

Da die durchflusszytometrische MRD-Messung nur für die CLL etabliert war, wurde der doppelte Ansatz nur bei den Messungen der CLL-Verlaufsmaterialien angewandt.

2.2.5 Auswertungsstrategie

2.2.5.1 Identifikation CD5⁺CD19⁺doppelt positiver Lymphozyten

Ein wichtiges Ziel der vorgelegten Arbeit war es, eine standardisierte Methode zu entwickeln, deren Ergebnisse möglichst unabhängig von der individuellen Erfahrung des Auswertenden sind. Dafür wurden folgende Auswertevorlagen mit der CellQuestPro v.4.0.1 Software kreiert (Abb.1). Grundlage waren Gatingstrategien, die bereits in Arbeiten von Rawstron et al. und Böttcher et al. verwendet wurden [23, 30, 35].

Zunächst wurden drei Punktwolken-Diagramme (Dot-Plots) erstellt, die sich alle nacheinander bedingen. Mittels Streulicht wird bei Leukozyten im Engwinkel zum Laserstrahl (FSC) die Zellgröße und im rechten Winkel dazu (SSC) die Zellgranularität bestimmt. Im ersten Streulichtdiagramm (FSC/SSC-Dot-Plot) umrahmt man die Leukozyten, um den Debris auszuschließen (Leukozytengate), der sich unten links darstellt (a) in Abb. 1).

In einem CD19/SSC-Dot-Plot wurden die B-Lymphozyten anhand ihrer Granularität und dem B-Zell-spezifischen Marker CD19 weiter eingegrenzt (Lymphozyten-Hilfsgate, b) in Abb.1). Diese CD19-positiven Lymphozyten werden nochmals in einem FSC/SSC-Plot dargestellt, um die Lymphozyten von den Zelldubletten zu trennen (Lymphozytengate), die sich rechts unten darstellen (c) in Abb. 1).

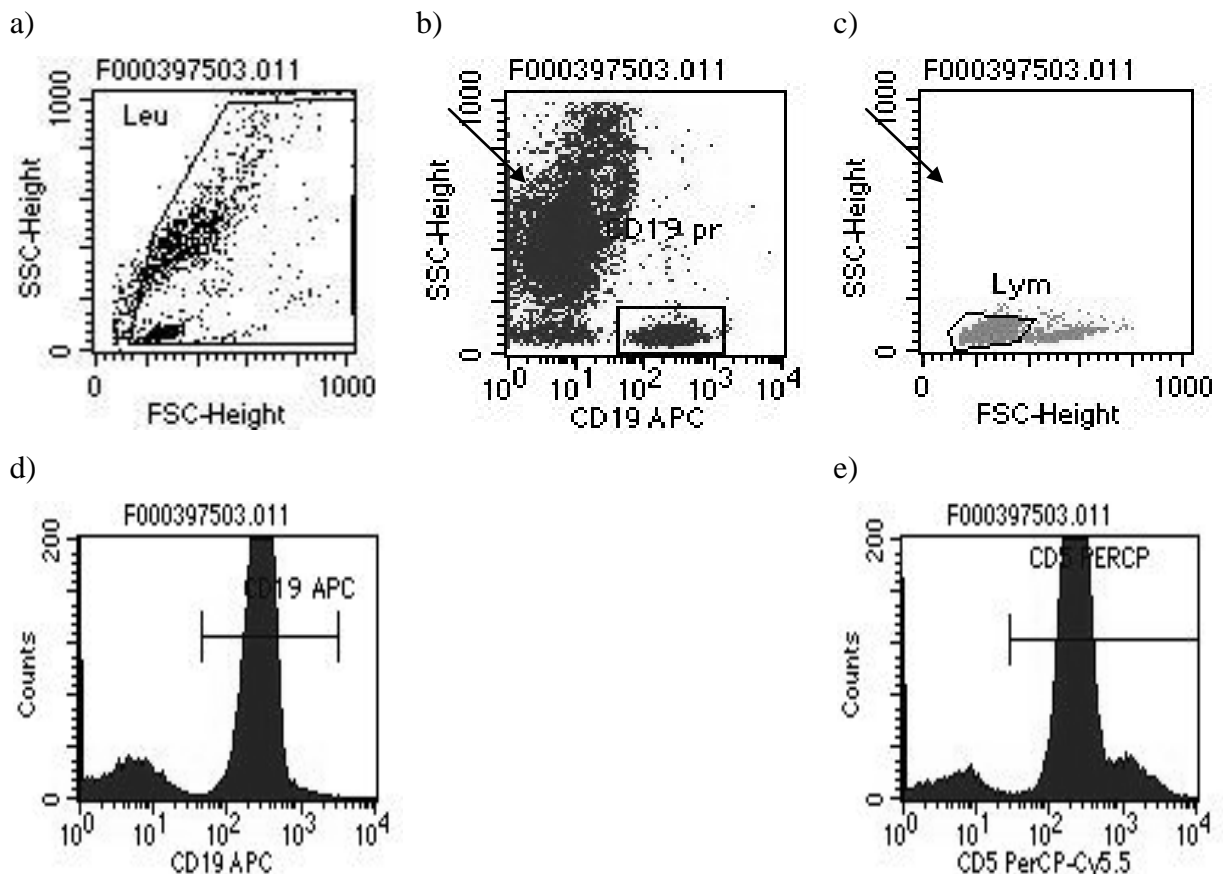
In einem Histogramm wurden anschließend alle Zellen im definitiven Lymphozytengate für den Marker CD19 angezeigt, um den CD19 positiven Messbereich festzulegen. Dazu wurde eine Region an den aufsteigenden Schenkel der CD19-positiven Population gesetzt. Als B-Lymphozyten wurden im Folgenden alle Zellen bezeichnet, die Streulichteigenschaften von Lymphozyten aufweisen (definitives Lymphozytengate) und CD19 positiv sind (CD19⁺Ly) (d) in Abb. 1).

Die CD5-Positivität wurde anhand der CD19 negativen Lymphozyten definiert. Dazu werden in einem weiteren Histogramm die CD5 Expressionsstärken aller Zellen angezeigt, die nicht CD19⁺Ly sind (T-Lymphozyten, Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen), im Knochenmark ggf. Erythroblasten). Dabei wurde die CD5⁺-Region an den absteigenden Schenkel der negativen Fraktion gesetzt (NK-Zellen und Erythroblasten) und durfte außerdem maximal 0,3% der Isotypkontrolle einschließen (CD5⁺Ly, e) in Abb. 1).

In Cellquest können Regionen über Boolesche Operatoren zu einem Gate verknüpft werden, so dass CD5CD19-positive Lymphozyten definiert werden konnten (CD5⁺CD19⁺-Ly).

Mit dieser Gatingstrategie wurden die T-Lymphozyten, Monozyten, NK-Zellen und die benignen, nicht reaktiven B-Lymphozyten weitestgehend ausgeschlossen. Sowohl MCL- als auch CLL-Zellen wurden im Folgenden als Subpopulationen der so definierten CD5⁺CD19⁺-Lymphozyten untersucht (siehe Abb. 2-4).

Abb. 1: Definition und Gatingstrategie von CD5⁺CD19⁺-Lymphozyten für CLL- und MCL-Zellen wie unter Punkt 2.2.5.1 beschrieben



2.2.5.2 Standardisierte Untersuchung der Expressionsstärken von Antigenen auf MCL- und CLL-Zellen und auf benignen CD5⁺CD19⁺-B-Lymphozyten

Verschiedene Antigene wurden daraufhin untersucht, ob sie innerhalb der CD5⁺ CD19⁺-Lymphozyten MCL- bzw. CLL-Zellen von benignen CD5⁺ B-Lymphozyten differenzieren konnten.

Die CD5/CD19-Positivität diente somit als fester Anker bei der Beschreibung des typischen Immunphänotyps von MCL und CLL. Weitere Oberflächenantigene (CD22, CD23, CD79b, CD81) wurden bezüglich ihrer Eignung zur Diskriminierung von malignen und benignen Zellen untersucht [38, 49, 51]. Zudem wurde die bei B-Zell-Neoplasien wichtige und pathognomonische Leichtkettenrestriktion untersucht.

Ein wesentliches Ziel der vorgelegten Arbeit sollte die objektive und quantitative Bestimmung von Antigenüber- und Unterexpression sein. Daher wurden alle Kandidatenantigene auf malignen und benignen CD5⁺-B-Lymphozyten analysiert. Es wurden geometrische Mittelwerte und unterschiedliche Perzentile der Fluoreszenzverteilungen auf benignen und malignen B-Lymphozyten ermittelt und diese Werte über das geometrische Mittel der Isotypkontroll-Messungen von Lymphozyten der gleichen Probe und des gleichen Fluorochroms normiert.

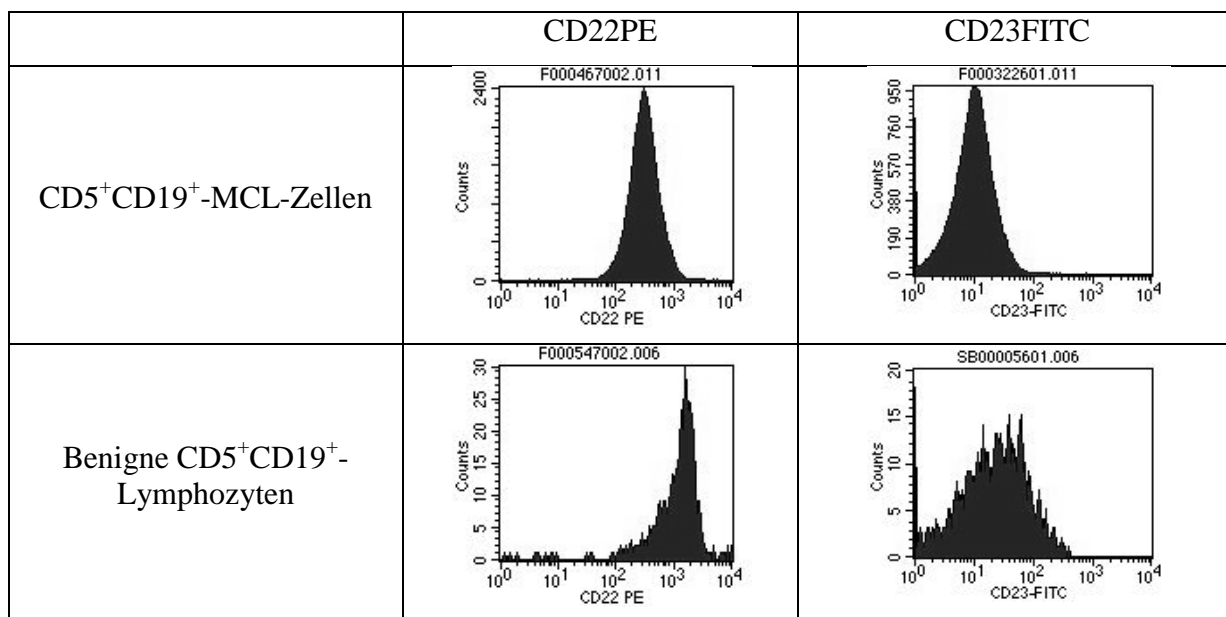
Die Fluoreszenzintensitätsverhältnisse (Mean Fluorescens Intensity Ratio, MFIR) wurden wie folgt festgelegt:

$$\text{MFIR}_{\text{von Antigen X}} = \frac{\text{Geometrisches Mittel}_{\text{von Antigen X}}}{\text{Geometrisches Mittel}_{\text{der Isotypkontrolle des Fluorochroms von Antigen-X}}}$$

Exemplarisch dargestellt für die 95. Perzentile von CD22PE:

$$\text{MFIR}_{95\% \text{ CD22PE}} = \frac{95.\text{Perzentile}_{\text{CD22PE}}}{\text{Geometrisches Mittel}_{\text{der PE-Isotypkontrolle}}}$$

Abb. 2: Unterschiedliche Expressionsstärken von CD22 (gemessen mit CD22PE) und CD23 (gemessen mit CD23FITC) auf MCL-Zellen und benignen CD5⁺CD19⁺-Lymphozyten



Aus den Untersuchungen der ersten Test-Kohorten wurden für MCL- bzw. CLL-Zellen für die o.g. Kennzahlen die arithmetischen Mittelwerte berechnet und in einem weiteren Schritt auf die CD5⁺CD19⁺-B-Lymphozyten gesunder Probanden angewandt, um den Anteil an falsch positiver Zellen bestimmen zu können.

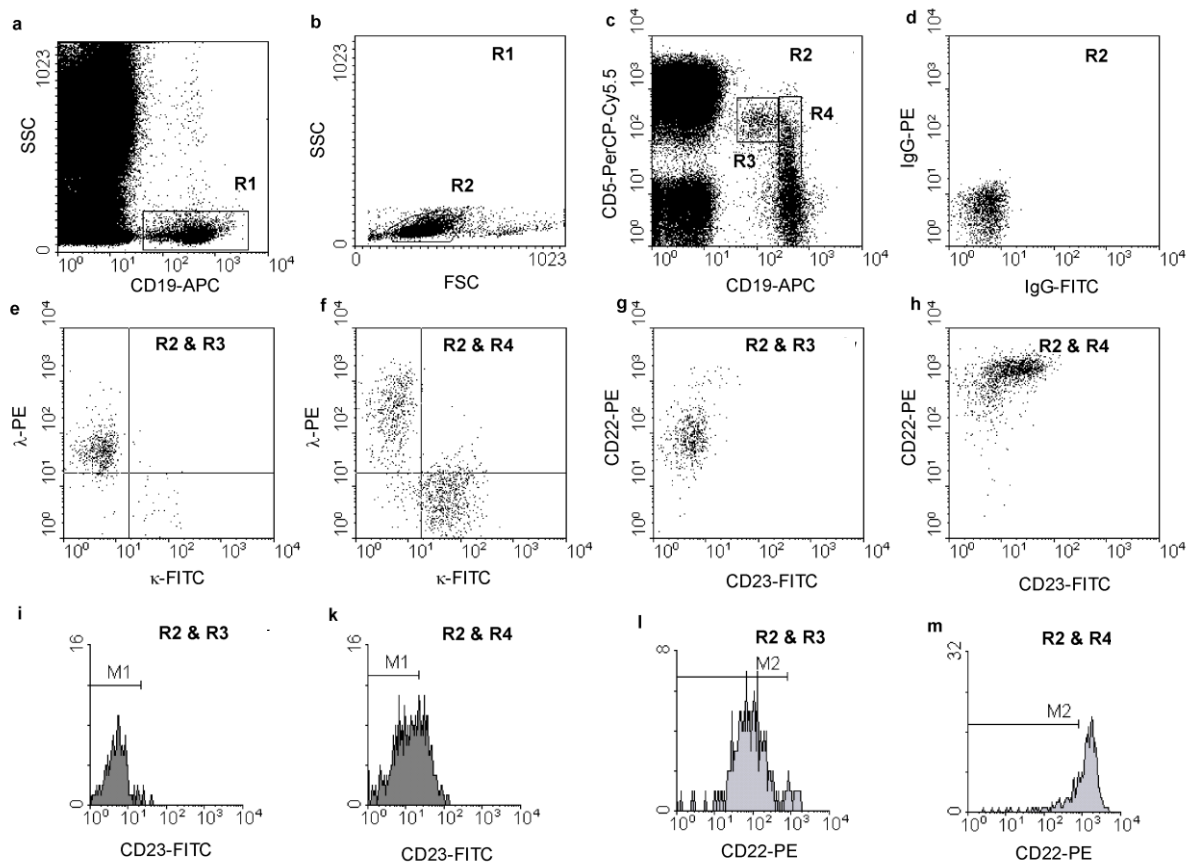
2.2.5.3 Auswertevorlagen für die objektive Auswertung von Expressionsstärke-Unterschieden zwischen malignen und benignen B-Zellen.

Anhand der Expressionsanalysen wurden folgende standardisierte MRD-Auswertevorlagen für MCL-Patienten (Abb. 3) und CLL-Patienten (Abb. 4) kreiert.

Die Definition der CD5⁺CD19⁺-Zellen erfolgte wie oben beschrieben. Dann wurden die Regionen der jeweiligen Diskriminierungsmarker (z.B CD22PE und CD79bFITC beim MCL) standardisiert nach dem Ergebnis der folgenden Berechnung eingestellt. Diese multipliziert die geometrischen Mittelwerte der Isotypkontrolle mit dem Mittelwert der Signal-Rausch-Verhältnisse der 95. Perzentilen der untersuchten MCL- bzw. CLL-Zellen. Dieser errechnete Kanal definiert die Grenze für die niedrig exprimierten Oberflächenantigene und somit zwischen malignen und benignen B-Lymphozyten.

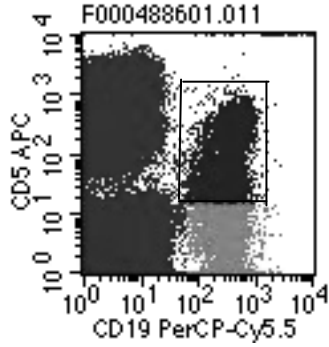
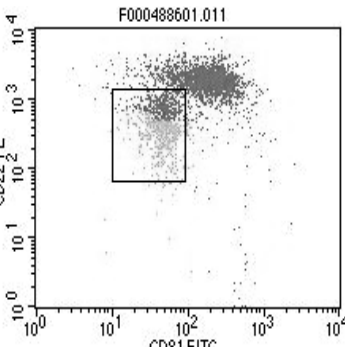
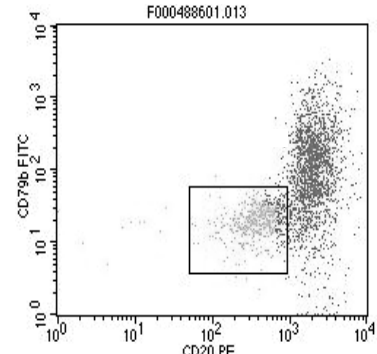
Dagegen wurde beim manuellen Setzen des MCL- bzw. CLL-Gates das Gate entsprechend der individuellen Erfahrung des Auswertenden auf die maligne Population gesetzt. Die Sensitivität zur spezifischen Erfassung von MCL- bzw. CLL-Zellen errechnete sich aus dem Mittelwert der falsch positiven Zellen, addiert mit der doppelten Standardabweichung, in Relation zur Gesamtzahl analysierter Leukozyten.

Abb. 3: Gating-Strategie zur Erfassung der MCL-Population



- a) Darstellung aller Leukozyten im SCC, grobe Festlegung der B-Lymphozyten mittels R1
b) B-Lymphozyten werden von dem Zellschrott (links) und den Zelldubletten (rechts) mittels R2 herausgated
c) Zeigt zwei unterschiedliche B-Zell-Populationen, CD19+CD5niedrig/+ (R4) und CD19niedrig/+CD5+ (R3), die separiert gated werden
d) Darstellung und Errechnung der mittleren Fluoreszenzstärken von FITC und PE (MFIIsotyp-FITC = 5,2; MFIIsotyp-PE = 4,9)
e) Quadrantenmarker der Leichtkettenrestriktion wird an den in Graphik c linken, unteren Quadranten gesetzt (CD19-CD5- Population in c) um mehr als 99% aller T-Zellen einzubeziehen, dargestellt ist ein monoklonaler, lambda exprimierender MCL-Klon ($\kappa/\lambda = 32/445 = 0,07$)
f) Polyklonale CD19+CD5+ B-Lymphozyten ($\kappa/\lambda = 648/448 = 1,4$)
g) CD22 und CD23 Expression auf der MCL-Population
h) CD22 und CD23 Expression auf der CD19+CD5+-Population
i-m) Standardisierte Gatingstrategie zur Erfassung des MCL-Immunphänotyps: M1 und M2 errechnen sich aus den MFI der Isotypkontrollen von FITC und PE x dem Median der MFIR, der 95. Perzentilen von CD22PE (154,1) und CD23FITC (4,5) bei MCL;
M1: $\text{FIR}_{95\text{CD}23\text{-FITC}} = 4,5 \times \text{MFI}_{\text{Isotyp-FITC}} = 4,5 \times 5,2 = 23,4$
M2: $\text{FIR}_{95\text{CD}22\text{-PE}} = 154,1 \times \text{MFI}_{\text{Isotyp-PE}} = 154,1 \times 4,9 = 755,1$
Eingeschlossener Anteil der Population in %: i) 99% k) 65% l) 98% m) 22%
M1 und M2 verknüpft entsprachen 21% aller R4/R2 Ereignisse und 98% aller in R3/R2 gateden Ereignisse
Das MCL-Niveau in dieser Probe lag bei $1,0 \times 10^{-3}$ (R3 Ereignisse / alle Leukozyten)
Die Konsensus-IGH-FR1-PCR zeigte ein monoklonales Signal vor einem polyklonalen Hintergrund

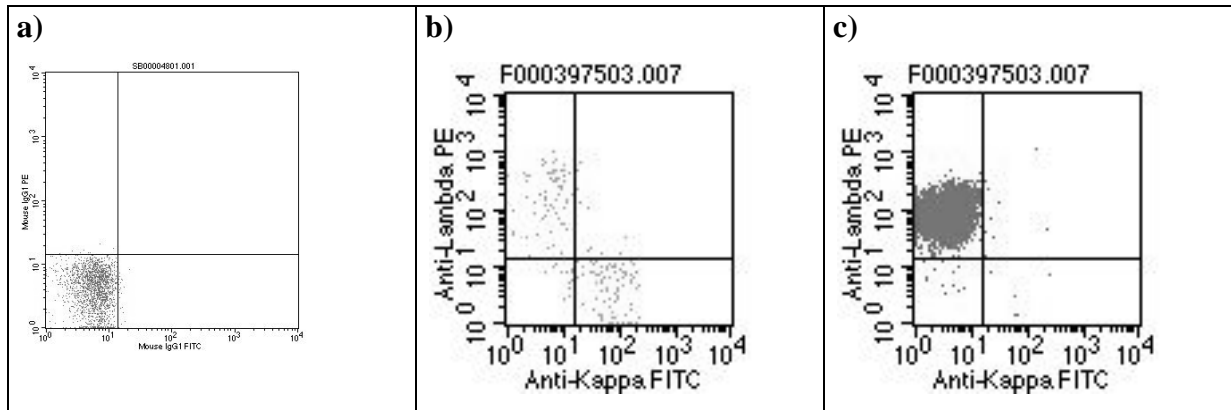
Abb. 4: Exemplarische MRD-Auswertung im Falle einer CLL anhand der CD5⁺CD19⁺-Lymphozyten nach individueller und starr definierter Auswertestrategie

	<ul style="list-style-type: none"> ➔ Dot-Plot der nach 2.5.1 definierten Lymphozyten ➔ Schwarz markiert und umrandet CD5⁺CD19⁺-Lymphozyten ➔ CLL-Zellen und benigne B-Lymphozyten sind nicht zu unterscheiden!
	<ul style="list-style-type: none"> ➔ Dot-Plot der CD5⁺CD19⁺-Lymphozyten ➔ Zwei unterschiedliche Populationen erkennbar ➔ CLL-Population CD22^{niedrig}CD81^{niedrig} manuell umrandet ➔ Hellgrau im CLL-Klon markiert die CLL nach starrer CD22^{95%}CD81^{95%}-Festlegung
	<ul style="list-style-type: none"> ➔ Dot-Plot der CD5⁺CD19⁺-Lymphozyten ➔ Zwei unterschiedliche Populationen erkennbar ➔ CLL-Population CD20^{niedrig}CD79b^{niedrig} manuell umrandet ➔ Hellgrau im CLL-Klon markiert die CLL nach starrer CD20^{95%}CD79b^{95%}-Festlegung

2.2.5.4 Analyse der Leichtkettenrestriktion

Die LKR der B-Zellen wurde gegen die Isotypkontrolle als negative Referenz bestimmt. Dafür wurde der Quadrantenmarker zunächst an den linken unteren Quadranten der Isotypkontrolle gesetzt (Abb. 5a). Dieser gesetzte Quadrant wurde in identischer Position in einem CD5⁺CD19⁺-Lymphozyten Dot-Plot dargestellt. Dabei wird das Verhältnis zwischen kappa und lambda exprimierenden B-Zellen errechnet. Als monoklonal wurde ein Verhältnis definiert, welches eine 4-fache Abweichung vom normalen Verhältnis (1,5) aufweist (0,37-6). Abb. 5b zeigt ein normales Verhältnis der Leichtkettenrestriktion auf B-Lymphozyten, Abb. 5c zeigt einen B-Zell-Klon, der die Leichtkette lambda exprimiert.

Abb. 5: Leichtkettenrestriktionsanalyse auf B-Zellen



2.3 Molekulare Analysen

2.3.1 Qualitativer Klonalitätsnachweis mittels Konsensus-IGH-FR1-PCR und GeneScan-Analyse

Für die qualitative molekulare MRD-Analyse wurde genomische DNA der Blut- bzw. Knochenmarkproben von den MCL- oder CLL-Patienten mittels Konsensus-IGH-FR1-PCR und anschließender GeneScan-Analyse auf B-Zell-Monoklonalität hin untersucht. Die Fragmentlängenanalyse der PCR-Produkte erfolgte über ein automatisches Sequenziergerät. DNA wurde nach der Standardarbeitsanleitung (GITC DNA-Extraktion) durch die Mitarbeiter des Labors für Hämatologische Spezialdiagnostik der II. Medizinischen Klinik des UK-SH, Campus Kiel, extrahiert.

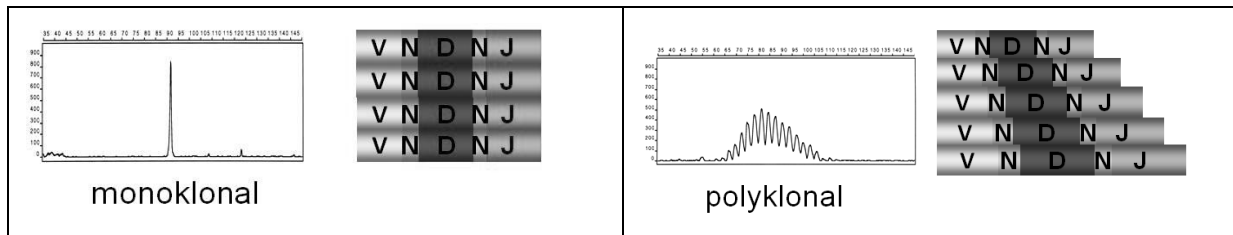
Von dieser DNA wurden 500ng mit einem IGH-FR1-Primer-Mix aller sieben V_H-Regionen und einem J_H-Konsensus Primer zu 300 bis 400 Basenpaare langen Fragmenten nach publizierten Methoden amplifiziert [23, 26, 27] (Tab. 7). Dabei ist der J_H-Primer mit dem FAM-Fluoreszenzfarbstoff markiert, der es dem automatischen Kapillarsequenzierer erlaubt, die Länge eines PCR-Produktes basengenau zu bestimmen [24]. Die PCR-Reaktionsbestandteile und die Cyclerkonditionen sind in der Tabelle 8 und 9 zusammengefasst.

Monoklonale PCR-Produkte zeichnen sich durch ein deutliches Fluoreszenzsignal identischer Länge aus (monoklonales Signal, s. Abb. 6A). Polyklonale PCR-Produkte weisen eine Gauß'sche-Größenverteilung auf (s. Abb. 6A).

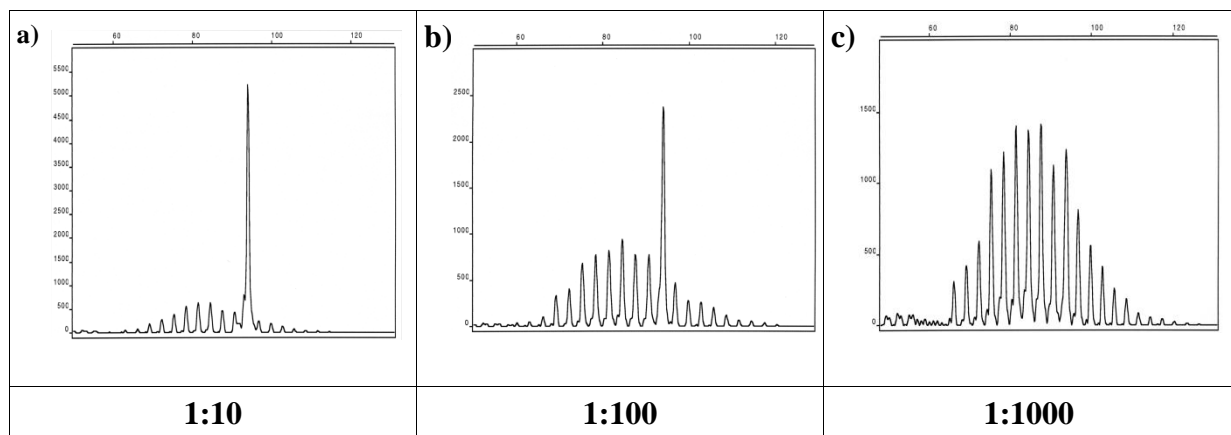
Je nach vorhandenem B-Zell-Hintergrund und Lage des klonalen PCR-Produkts in Relation zu den polyklonalen Amplicons erlaubt diese Methode den Nachweis klonaler Lymphomzellen mit einer Nachweisgrenze von unter 0,1%-5% (Abb. 6B).

Abb. 6: Auswertung der GeneScan-Analyse der Konsensus-IGH-FR1-PCR. (A) zeigt links ein monoklonales Signal, PCR-Produkte einer Länge und rechts eine polyklonale, Gauß'sche Verteilung. (B) Verdünnungsreihe klonaler DNA in polyklonaler DNA.

A)



B)



Tab. 7: Primersequenzen für die IGH-FR1-PCR

Primer	Sequenz
FR1-V _H 1-2	5'- GGC CTC AGT GAA GGT CTC CTG CAA G -3'
FR1-V _H 2nw	5'- GTC TGG TCC TAC GCT GGT GAA ACC C -3'
FR1-V _H 3-7	5'- CTG GGG GGT CCC TGA GAC TCT CCT G -3'
FR1-V _H 4-4	5'- CTT CGG AGA CCC TGT CCC TCA CCT G -3'
FR1-V _H 5-51	5'- CGG GGA GTC TCT GAA GAT CTC CTG T -3'
FR1-V _H 6	5'- TCG CAG ACC CTC TCA CTC ACC TGT G -3'
J _H Konsensus	5'- (FAM)-CTT ACC TGA GGA GAC GGT GAC C -3

Tab. 8: Konsensus-IGH-FR1-PCR

Reaktionsbestandteile	Ausgangskonzentration	µl / Ansatz
DNA	100 ng/µl	5
dNTP`S	25 mM	0,4
Puffer	10x	5
MgCl	25 mM	3
IGH-FR1-Mix	Je 10 pmol/µl	1
IGH-J _H Konsensus-Primer	10 pmol/µl	1
Rinder-Albumin	BSA 20 mg/ml	1
AmpliTaq Gold	5U/µl	0,2
Aqua		auf 50

Tab. 9: Cyclerkonditionen einer Konsensus-IGH-FR1-PCR

Temperatur	Zeit in Minuten	PCR-Phasen
94°C	10	Denaturierung zu Beginn
94°C	1	35x Denaturierung
60°C	1	
72°C	0,5	
72°C	30	Abschluss-Elongation

2.3.2 Sequenzierung klonaler IGH-FR1-PCR-Produkte

Bei Nachweis klonaler Konsensus-IGH-FR1-Amplifikate erfolgte eine direkte Sequenzanalyse der PCR-Produkte. Die Sequenzierung basiert auf der Kettenabbruchreaktion nach Sanger et al. [52]. Dabei wurden zu der PCR-Reaktion vier fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTPs) hinzugegeben. Im Vergleich zu den üblichen Desoxynukleotiden (dNTPs) unterscheiden sich die ddNTPs durch das Fehlen der 3'-OH-Gruppe. Dadurch ist keine Verbindung zum nächsten Nukleotid möglich und es kommt zu einem Kettenabbruch.

Nach einer Aufreinigung der Sequenzierreaktion konnten die nun fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente mit Hilfe eines automatischen Sequenzierers in einer Kapillare elektrophoretisch aufgetrennt und durch Laserdetektion qualitativ analysiert werden. Die Analyse erfolgte auf einem ABI 3100-Avant nach Anweisung des Herstellers.

Generell wurden für die Sequenzierungsansätze die gleichen Primer benutzt wie für die Konsensus IGH-FR1-PCR-Ansätze.

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit den veröffentlichten V_H, D_H und J_H- Genomsequenzen (DNAPLOT-Software und IMGT Datenbank; www.imgt.cines.fr initiator and coordinator; Marie-Paul Lefranc, Montpellier, France) verglichen, um die Lage der patientenspezifischen Sequenzen der junktionalen Region in Bezug auf die bekannten V_H-D_H- und J_H-Genregionen der hinterlegten Keimbahnsequenzen sowie die Mutationsfrequenz gegenüber der Keimbahnsequenz festlegen zu können.

2.3.3 ASO-IGH-RQ-PCR

Zur sensitiven MRD-Verlaufsanalyse der untersuchten CLL-Fälle wurden klonspezifische real-time quantitative (RQ) – PCR Assays nach publizierten Methoden [23, 26, 29] etabliert. Hierzu wurden zunächst allelspezifische Oligonukleotide (ASO) entworfen, die komplementär zur klonspezifischen Sequenz der hypervariablen CDR3-Region der klonalen IGH-Genumlagerungen waren. Diese wurden zusammen mit Konsensus-TaqMan-Sonden und Konsensus-Primern in eine RQ-PCR eingesetzt.

Während der Amplifikation kommt es durch die Taq-Polymerase zu einem Abbau der TaqMan®-Sonde, die über die räumliche Trennung des Reporterfarbstoffs vom Quencherfarbstoff zu einer Zunahme der Intensität der Reporterfluoreszenz führt, die wiederum proportional zur Menge der generierten PCR-Produkte ist. Die Reporterfluoreszenzintensität wird gegen die Anzahl der Zyklen gemessen. Ein Schwellenwert (C_T, threshold cycle) gibt denjenigen PCR-Zyklus an, zu dem die Fluoreszenzintensität vom Hintergrundsignal unterschieden werden kann. Eine Quantifizierung der Kopienzahl einer Zielgensequenz in einer Verlaufsprobe erfolgt durch den Vergleich des C_T der Probe mit den C_T –Werten einer Standardkurve, die durch eine Verdünnungsreihe der DNA des primärdiagnostischen Materials mit bekannter Zielgen-Kopienzahl hergestellt wird. Diese Verdünnungsreihe wird durch serielle Verdünnungen des primärdiagnostischen Materials in polyklonaler DNA (gepoolte Buffy Coats von 10 gesunden Spendern) in den Stufen 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 5x10⁻⁴, 10⁻⁴, 5x10⁻⁵, 10⁻⁵, 10⁻⁶ hergestellt.

Durch die gleichzeitige Amplifizierung der Verdünnungsreihe und der Verlaufsproben kann somit die Kopienzahl der Ziel-Sequenz gemessen werden. Die Verdünnungsreihe ermöglicht zudem die Bestimmung der Sensitivität des Assays, die durch die höchste Verdünnungsstufe definiert wird, bei welcher noch ein spezifisches Fluoreszenzsignal generiert wird.

Um die Unterschiede der Amplifizierbarkeit der verschiedenen Proben eines Patienten

auszugleichen, wird die Kopienzahl des Housekeeping-Gens Albumin als interne Referenz ermittelt. Hierfür wird in einer Albumin-RQ-PCR seriell verdünnte polyklonale DNA gegen die zu untersuchenden Patienten-DNA's amplifiziert. Der Quotient aus Albuminkopienzahl der Verlaufsprobe zur Albuminkopienzahl des Ausgangsmaterials definiert somit die Amplifizierbarkeit der Patientenprobe.

Tab. 10: Reaktionsansatz einer RQ-PCR

Reaktionsbestandteile	Ausgangskonzentration	Menge / Ansatz
DNA	100 ng/μl	6 μl
Universal Master mix (2x)		
ASO-Primer	20 pmol/μl	300 nM
IGH-J _H Konsensus-Primer	20 pmol/μl	300 nM
TaqMan-Sonde	20 pmol/μl	100 nM
Rinder-Albumin (BSA 5%)	20mg/ml	2 μl
Aqua		Auf 25 μl

Tab. 11: Cyclerkonditionen einer RQ-PCR

Temperatur	Zeit in Minuten	PCR-Phasen	
95°C	10	Denaturierung zu Beginn	
95°C	0,25	35x	Denaturierung
60°C	1		Annealing
72°C	0,5		Elongation
72°C	30	Abschluss-Elongation	

Tab. 12: Übersicht der verwendeten Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Modell
Thermocycler	Applied Biosystems	GeneAmp PCR System 9700
Gelelektrophoresekammer	Peqlab Biotechnology	40-2314
Spannungsgeber	BioRad	PoerPac 300
UV-Transilluminator	Spectroline	TC-312-A
Kamera, Film	Polaroid	Polaroid MP Land Camera, Polaroid 677
PCR-Aufreinigungsplatte	Millipore	MANU03010
Unterdruck-Rahmen	Millipore	Multi-Screen 384
Tisch-Kleinzentrifuge	Eppendorf	54150
Doppel-Plattenzentrifuge	Heraeus	Labofuge 400

Sepharose-System	Millipore	Multiscreen MAHVN4510
Automatischer Sequenzierer	Applied Biosystems	ABI-377 oder ABI-3100 Avant
Laborwaage	Sartorius	PT-1200
Rotations-Mischer	Scientific Industries	Vortex Gene 2 G560E
real-time-PCR	Applied Biosystems	ABI PRISM 7700

Tab. 13: Übersicht der eingesetzten Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Anwendung
DNTP Mix	Carl Roth	PCR
GeneAmp 10xPCR Puffer	Applied Biosystems	PCR
MgCl		PCR
AmpliTaq Gold DANN Polymerase	Applied Biosystems	PCR
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich	PCR
Oligonukleotide (Primer, Sonden)	TIB Molbiol	PCR, Sequenzierung, RQ-PCR
5xPuffer		Sequenzierung
BigDye1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems	Sequenzierung
Sephadex G-50 Fine Sepharose	GE Healthcare	Sequenzierung
HiDi Formamid	Applied Biosystems	Sequenzierung
POP-6 Polymer for Genetic Analyzer	Applied Biosystems	Sequenzierung
Universal Master mix	Applied Biosystems	RQ-PCR
ASO-Primer	unterschiedliche Hersteller	RQ-PCR
TaqMan-Sonde®		RQ-PCR
BSA 5%		RQ-PCR
Buffy coat		RQ-PCR

2.4 Statistische Analysen

Die statistischen Untersuchungen wurden mit Hilfe des Graphpad Prism-Programms[®] durchgeführt. Zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung zweier Verteilungen wurde der Mann-Withney-Test angewandt.

Spearman's Rangkorrelationskoeffizient, als parameterfreies Maß für Korrelationen, wurde berechnet, um den Zusammenhang zweier unterschiedlicher Untersuchungsmethoden darzustellen (z.B. zwischen FACS und PCR). Die Standardabweichungen bezogen sich auf die Gauß'sche Normalverteilung. Werte kleiner 0,05 wurden als signifikant bewertet.

Die Sensitivität gibt den Anteil der korrekt als positiv klassifizierten Proben an der Gesamtheit der tatsächlich positiven Objekte an.

Die Spezifität gibt den Anteil der korrekt als negativ klassifizierten Proben an der Gesamtheit der tatsächlich negativen Objekte an.

Der positive prädiktive Wert gibt den Anteil der korrekt als positiv erkannten Ereignisse an der Gesamtheit der als positiv erkannten Ereignisse an.

3. Ergebnisse

3.1 Titrationsergebnisse und Optimierung der Antikörper-Fluorochrom-Auswahl

Alle Antikörper wurden titriert, um eine optimierte Auftrennung zwischen Lymphozytensubpopulationen sowie zwischen den benignen und den malignen Populationen zu erreichen. Die Titrationsergebnisse sind in der folgenden Tabelle 14 aufgeführt.

Tab. 14: Signal-Rausch-Verhältnisse der untersuchten Antikörper auf benignen Lymphozyten, jeweils optimales Signal-Rausch-Verhältnis ist fett hervorgehoben.

	Antikörpervolumen [µl] / 100 µl Zellsuspension					
	1	2	5	10	20	30
	Signal-Rausch-Verhältnisse					
Antikörper						
CD5 FITC			92	93,5	78	94
CD5 PerCP-Cy5.5			141,5	167	186	182
CD5 APC			80	88	92	82,5
CD19 PerCP-Cy5.5			88	105	113	111
CD19 APC	209	216	187	157		
CD20 FITC			101	127	134	132,5
CD22 FITC			12	13	13	13
CD22 PE	184	195	208	203		
CD43 PE	12	20	33	42		
CD79b FITC	28,5	29	29	29		
CD79b PE			18	19	25	27
CD81 FITC			42	41	27,5	42
CD81 PE			27	57,5	101,5	134

Für MRD-Bestimmungen bei CD5⁺ B-Zell-Lymphomen ist die sichere Identifizierung der CD5⁺CD19⁺ Lymphozyten essentiell. Hierfür ist ein möglichst gutes SRV nötig. Wir überprüften daher, ob der Austausch der Fluorochrom-Antikörperkombination von der bisherigen CD5-APC/CD19-PerCp-Cy5.5 Konstellation zu einem insgesamt besseren Ergebnis führen würde. Ursächlich war hierfür eine Beobachtung, dass MCL häufig eine deutlich reduzierte CD19-Expression im Vergleich zu benignen B-Zellen aufweisen (siehe Abb. 3).

Erwartungsgemäß ließ sich für CD19 (Klon SJ25C1) mit APC ein deutlich höheres maximales SRV als mit PerCP-Cy5.5 erzielen (216 vs. 113). Unerwarterweise konnte andererseits das SRV auch durch den Wechsel von CD5 APC (Klon UCHT2) auf CD5 PerCP-Cy5.5 (Klon L17F12) verbessert werden, wobei es sich wahrscheinlich um einen Effekt des Klons handelt. Insgesamt entschieden wir uns daher bei unserem MRD-Ansatz für MCL zum Austausch des Konjugates, um die gerade hier wesentliche Diskriminierung der malignen B-Zellen von Nicht-B-Lymphozyten zu erleichtern.

3.2 Etablierung der FACS-Panels

3.2.1 Expressionsstärkenanalyse aberrant exprimierter Antigene auf MCL-Zellen im Vergleich zu benignen B-Lymphozyten

Es wurden zunächst die medianen Signal-Rausch-Verhältnisse der analysierten Antigene auf MCL- und benignen CD5⁺ Blut- und Knochenmarkzellen untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass CD22 PE auf den benignen B-Lymphozyten des peripheren Blutes stark exprimiert wird. Auf den CD5⁺CD19⁺-Lymphozyten der Knochenmarkproben von Gesunden findet sich CD22 PE auf der Zelloberfläche im Mittel niedriger ausgeprägt als auf reifen, peripheren B-Zellen gesunder Spender.

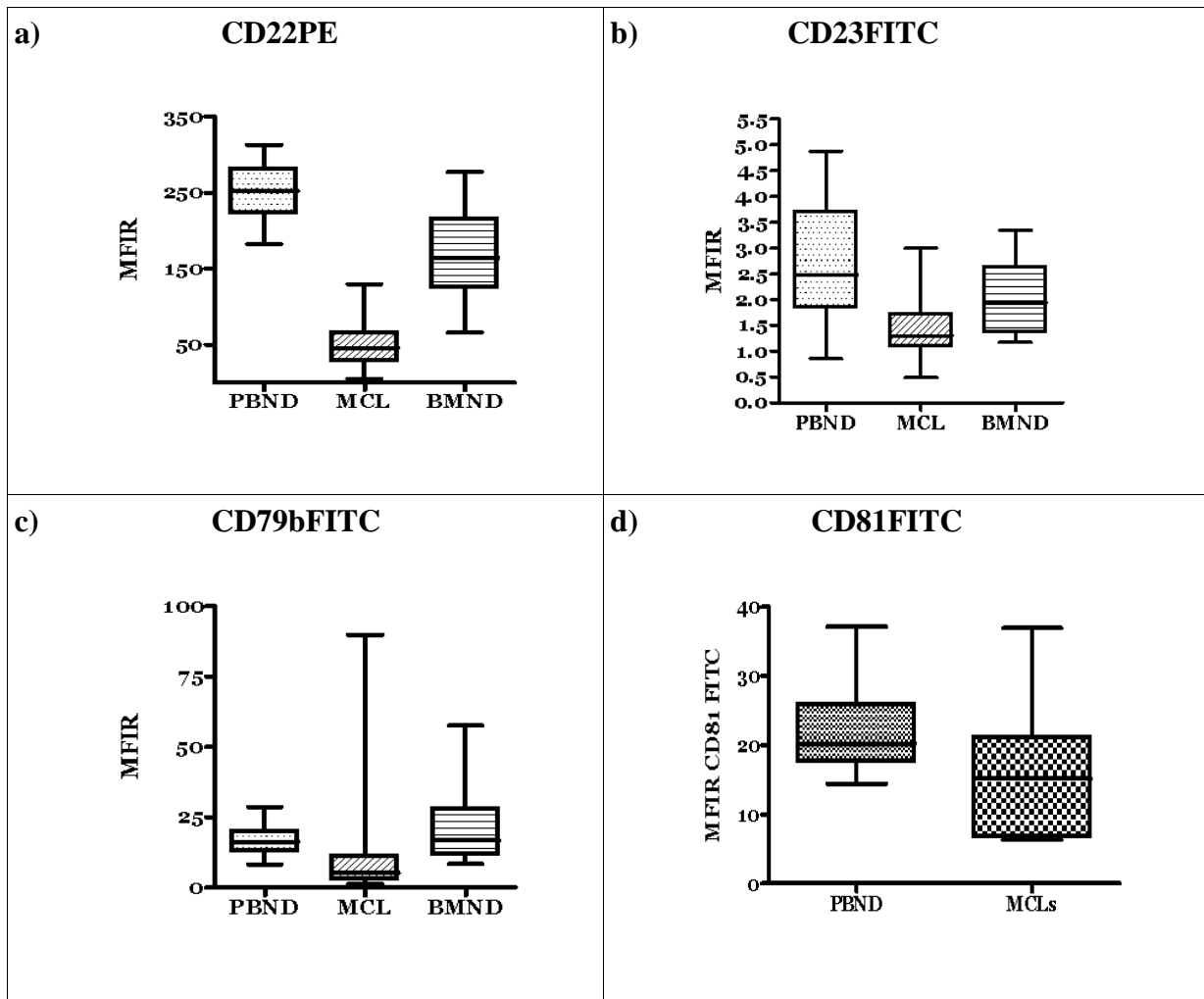
Die MCL-Zellen exprimierten CD22 PE schwach (CD22^{niedrig}). Dieser Marker wurde im Vergleich zu benignen B-Lymphozyten im peripheren Blut, wie auch zu denen im Knochenmark, signifikant ($p < 0,0001$) unterexprimiert.

Die Expressionsstärke von CD22PE wurde jeweils in den Kombinationen CD23FITC/CD22PE/CD5PerCP-Cy5.5/CD19APC und CD79bFITC/CD22PE/CD5 PerCP-Cy5.5/CD19APC untersucht, um eine mögliche Interaktion mit den verschiedenen FITC-konjugierten Antikörpern (CD79bFITC und CD23FITC) beurteilen zu können. Dabei zeigten sich nahezu identische Mediane der Signal-Rausch-Verhältnisse des geometrischen Mittelwertes und damit ein konstantes Verhalten des Antikörpers in beiden Röhrchen (53,84 zu 54,68, $p = 0,91$).

Die Abbildung 7 zeigt die unterschiedlichen Expressionsstärken und die Auftrennung von MCL- gegenüber benignen CD5⁺ Zellen.

CD23FITC wurde auf MCL-Zellen gar nicht oder schwach exprimiert (CD23^{-/niedrig}). Im peripheren Blut stellte sich ein signifikanter Unterschied zu den ebenfalls CD23 schwach exprimierenden gesunden B-Lymphozyten dar ($p < 0,0001$), der im Knochenmark weniger deutlich ausfiel ($p = 0,0125$). Dennoch überschnitten sich die Bandbreiten der MFIR's der gewählten Antigene teilweise, was konsekutiv zu einer Abnahme der Sensitivität führte (Abb. 7)

Abb. 7: Signal-Rausch-Verhältnisse für (a) CD22, (b) CD23, (c) CD79b und (d) CD81 analysiert als MFIR auf MCL im Vergleich zu Signal-Rausch-Verhältnissen von CD5+ B-Zellen im peripheren Blut (PBND) und im Knochenmark gesunder Spender (BMND).



Die Kastengraphik zeigt jeweils den Median, das obere und untere Quartil und die beiden Extremwerte an.

CD79bFITC wurde auf MCL-Zellen sehr inhomogen exprimiert. Zu beobachten war eine bimodale Verteilung. In 65 Prozent der Fälle wurde dieses Antigen unterexprimiert ($CD79b^{\text{niedrig}}$), in 5 Prozent überexprimiert ($CD79b^{\text{hoch}}$) und in 30 Prozent zeigte sich kein Expressionsunterschied zu den benignen B-Lymphozyten ($CD79b^+$). MCL-Zellen zeigten im Vergleich zu den gesunden B-Lymphozyten zwar im Median im Blut ($p < 0,0001$) und im Knochenmark ($p = 0,0056$) eine signifikante Unterexpression von CD79b, dennoch ist CD79b wegen seiner Variabilität ein schwierig anzuwendender MRD-Marker. Die Abbildung 7 zeigt die Streubreite von CD79bFITC und somit die Problematik dieses Markers zur Detektion residueller MCL-Zellen.

Die Expressionsuntersuchung von CD81FITC in 11 MCL-Proben ergab keinen deutlichen Unterschied zu benignen B-Lymphozyten ($p < 0,0214$, Abb. 7).

Die Mediane der Signal-Rausch-Verhältnisse sind in der Tabelle 15 zusammengefasst.

Aus der Analyse der Signal-Rausch-Verhältnisse der aberranten Moleküle CD22, CD23, CD79b und CD81 auf CD5⁺-MCL-Zellen und deren benignen Entsprechungen in Blut und Knochenmark ließ sich deren Eignung als MRD-Marker abschätzen.

CD22 erwies sich aufgrund des größten und homogensten Unterschiedes zu benignen B-Zellen als am besten geeignet. CD23 war der nächstbeste Marker. CD79b war aufgrund der interindividuellen Unterschiede (Über- oder Unterexpression im Vergleich zum Gesunden bei unterschiedlichen Patienten) als MRD-Marker ungeeignet. CD81 zeigte keine signifikanten Expressionsstärke-Unterschiede und war damit als MRD-Marker ungeeignet.

Trotz deutlicher Unterschiede in der medianen Expressionstärke von CD22 und CD23 zwischen Gesunden und MCL-Patienten, zeigten sich die Zellpopulationen teils überlappend. Zur standardisierten Auswertung von MRD muss jedoch für jede einzelne Zelle eine eindeutige Zuordnung der Dignität möglich sein.

Hierzu wurde zunächst die durchschnittliche 1. Perzentile bei Gesunden untersucht. Für die drei signifikant unterexprimierten Marker CD22, CD23 und CD79b beschreibt die erste Perzentile den Bereich, in dem sich dasjenige Prozent der gesunden Zellen befindet, das am weitesten in den Bereich der MCL hineinragt.

Zur weiteren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde versucht, den Begriff der „Unterexpression“ zu definieren. Da die beiden gewählten Marker keine eindeutige Trennung zu den benignen CD5⁺CD19⁺-B-Lymphozyten herstellten, wurden zunächst die Kanäle der 90., 95. und 99. Perzentile von 24 MCL-Patienten untersucht und mit der 1. Perzentile der CD5⁺-B-Lymphozyten gesunder Spender verglichen.

Es diente der Median der Signal-Rausch-Verhältnisse der 95. Perzentile von CD22PE (154,1) und der von CD23FITC (4,5) auf MCL als Grenzwert (s. Tab. 15). Anhand der Normalprobanden konnte der Anteil an falsch positiven CD5⁺CD19⁺-Lymphozyten mit dem festgesetzten MCL-Immunphänotyp ermittelt werden. Durchschnittlich fielen 0,1% aller benignen Leukozyten in das MCL-Gate. Addiert wurden zwei Standardabweichungen, was eine maximale Sensitivität von $2,4 \times 10^{-3}$ für diesen Antikörperansatz ergab. Durchschnittlich 104 benigne B-Lymphozyten wurden von 100.000 gemessenen Leukozyten als maligne markiert. Ohne CD22PE erreichte der Ansatz eine Sensitivität von $8,4 \times 10^{-3}$. Nur mit dem CD22PE-Antikörper ist der Ansatz deutlich sensitiver ($3,0 \times 10^{-3}$) und zeigt, dass CD22PE deutlich besser zu benignen B-Lymphozyten diskriminierte als CD23FITC. Die Anzahl an falsch positiven Zellen im peripheren Blut zu den Knochenmarkproben war nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,0889$). Ein typischer MCL-Immunphänotyp ist CD23^{niedrig}CD22^{niedrig}CD5⁺CD19^{niedrig}.

Tab. 15: Mediane der Signal-Rausch-Verhältnisse ausgewählter Perzentilen und der Geometrischen Mittelwerte auf MCL-Zellen und benignen CD5⁺CD19⁺-Lymphozyten

		MCL	Peripheres Blut gesunder Spender	Knochenmark gesunder Spender
CD22PE	n	75	25	8
	1. Perzentile	-	39,6	12,5
	10. Perzentile	-	105,9	-
	20. Perzentile	-	164,6	-
	30. Perzentile	-	225,2	-
	Geometrisches Mittel (Spanne)	53,8 (12,7- 216,3)	251,9* (182,5-313,1)	164* (66,4-277,1)
	40. Perzentile	-	260,7	-
	50. Perzentile	-	303,9	-
	95. Perzentile	154,1	-	-
	99. Perzentile	-	747,6	603,4
CD23FITC	n	75	25	8
	1. Perzentile	-	0,2	0,2
	10. Perzentile	-	0,8	-
	20. Perzentile	-	1,4	-
	30. Perzentile	-	2,1	-
	Geometrisches Mittel (Spanne)	1,3 (0,5-2,8)	2,5* (0,9-4,9)	2,0** (1,2-3,3)
	40. Perzentile	-	2,8	-
	50. Perzentile	-	4,6	-
	95. Perzentile	4,5	-	-
	99. Perzentile	-	39,7	16,7
CD79bFITC	n	75	25	8
	1. Perzentile	-	0,6	0,5
	10. Perzentile	-	4,3	-
	20. Perzentile	-	7,7	-
	30. Perzentile	-	10,6	-
	40. Perzentile	-	13,5	-
	Geometrisches Mittel (Spanne)	6,1 (1,2- 90,2)	16,3* (8,2-28,6)	16,7** (8,3-57,5)
	50. Perzentile	-	16,7	-
	95. Perzentile	16,9	-	-
	99. Perzentile	-	172,7	247,5
CD81FITC	n	11	25	0
	Geometrisches Mittel (Spanne)	15,2 (6,4- 36,9)	20,2§ (14,4-37,1)	-

*p < 0,0001; ** p < 0,05; § nicht signifikant, jeweils MCL vs. gesunde Referenzpopulation

Tab. 16: Immunphänotypische Abweichungen, Anwendbarkeit und Spezifität zum durchflusszytometrischen MRD-Nachweis bei MCL.

	Angewandte Gates auf CD5 ⁺ CD19 ⁺ -Lymphozyten				
	CD22 ^{niedrig}	CD23 ^{niedrig}	CD79b ^{niedrig}	CD22 ^{niedrig} + CD79b ^{niedrig}	CD22 ^{niedrig} + CD23 ^{niedrig}
Erfasste MCL-Zellen in %					
Median	93	97	97	86	88
Spanne	31-100	71-100	1-100	0,5-100	29-100
% der MCL-Proben in denen					
95%	41	69	64	25	28
90%	66	83	73	40	45
85%	70	89	75	51	58
80%	79	98	76	60	70
75%	88	98	77	65	85
70%	91	100	79	69	93
65%	93	100	80	74	93
60%	93	100	85	80	93
der MCL-Zellen erfasst wurden					
% falsch positiver Ereignisse von allen gemessenen Leukozyten					
<u>Peripheres Blut:</u>					
Mittelwert	0,12	0,31	0,39	0,06	0,10
Mittelwert + 2 x Standardabweichung	0,30	0,84	1,04	0,16	0,24
<u>Knochenmark:</u>					
Mittelwert	0,05	0,12	0,09	0,02	0,05
Mittelwert + 2 x Standardabweichung	0,13	0,32	0,27	0,04	0,11
% falsch positiver Ereignisse von CD5 ⁺ CD19 ⁺ -Lymphozyten					
<u>Peripheres Blut:</u>					
Mittelwert	24,0	54,7	66,4	12,2	18,2
Mittelwert + 2 x Standardabweichung	39,4	89,0	87,3	22,4	33,2
<u>Knochenmark:</u>					
Mittelwert	37,6	71,7	58,8	20,4	32,8
Mittelwert + 2 x Standardabweichung	82,6	124,9	100,3	50,8	73,5

3.2.2 Durchflusszytometrische Analysen zur CLL

3.2.2.1 Expressionsstärkenanalyse aberrant exprimierter Antigene auf CLL-Zellen im Vergleich zu benignen B-Lymphozyten

Es wurden Blutproben prätherapeutischer CLL-Patienten mit Blutproben gesunder Spender verglichen, um die Expressionsstärkedifferenzen ausgewählter Antigene objektiv zu analysieren.

Es konnte gezeigt werden, dass alle drei untersuchten Antigenkombinationen CD81FITC/CD22PE, CD79bFITC/CD20PE und CD20FITC/CD43APC auf CD5⁺CD19⁺-Lymphozyten im Vergleich zwischen den CLL-Zellen und den benignen B-Lymphozyten alle hoch signifikant unterschiedlich exprimiert wurden ($p < 0,0001$). Dabei fiel lediglich bei dem CD81FITC-Marker eine Überlappung der Streubreiten auf, was sich bei den Sensitivitätsberechnungen als ungünstig bestätigte (s. Abb. 8 und Tab. 17).

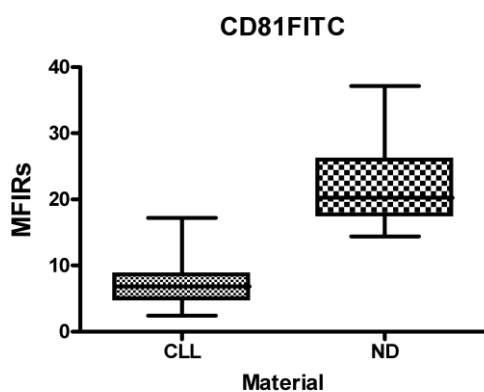


Abb. 8: Signal-Rausch-Verhältnisse der geometrischen Mittelwerte (MFIR) von CD81 FITC auf CLL-Zellen und benignen CD19⁺CD5⁺Lymphozyten (ND).

Die Kastengraphik zeigt jeweils den Median, das obere und untere Quartil und die beiden Extremwerte an.

Alle verwendeten Antigenmarker, bis auf CD43 APC, wurden auf CLL-Zellen im Vergleich zu benignen B-Lymphozyten unterexprimiert (s. Abb. 8 und 9). CD43 gilt im Vergleich als positiv exprimiert (CD43⁺) und wurde somit weiter manuell gated.

In der Tabelle 17 sind die Mediane der MFIR's für die verschiedenen unterexprimierten Marker auf CLL-Zellen und benignen CD5⁺CD19⁺-Lymphozyten aufgelistet.

Betrachtet man die Sensitivitäten der einzelnen Marker und deren Kombinationen auf CD5⁺CD19⁺-Lymphozyten, stellte sich CD20^{niedrig} mit CD43⁺ als sensitivste Kombination heraus. Zur Definition der „niedrig“-Grenze diente wie bei den MCL-Zellen der Median der 95. Perzentilen. Dabei war der Dreifarben-Ansatz mit CD20^{niedrig}FITC/CD5⁺PE/CD19⁺PerCP-Cy5.5 ($2,3 \times 10^{-4}$) fast genau so sensitiv wie mit CD43⁺ APC ($1,3 \times 10^{-4}$).

Deutlich wurde ebenfalls die Überlegenheit des FITC-konjugierten CD20-Antikörpers gegenüber dem PE-konjugierten. Fast eine logarithmische Stufe unterschied beide Antikörper in ihrer Sensitivität ($2,3 \times 10^{-4}$ mit CD20 FITC vs. $1,3 \times 10^{-3}$ mit CD20 PE).

Tab.17: Mediane der Signal-Rausch-Verhältnisse der geometrischen Mittelwerte und ausgewählter Perzentilen auf CLL-Zellen und benignen CD5+-B-Lymphozyten

		CLL	gesunde Spender
CD20FITC	n	30	19
	Geometrisches Mittel	11,5	152,5*
	90.Perzentile	36,7	-
	95.Perzentile	47	-
	99.Perzentile	77,3	-
CD20PE	n	30	25
	1.Perzentile	1,8	101,8
	5.Perzentile	-	192,1
	10.Perzentile	-	228,2
	20.Perzentile	-	286,8
	Geometrisches Mittel (Spanne)	33,7 (6,8-84,5)	391,7* (257,4-590,0)
	90.Perzentile	106,7	-
	95.Perzentile	139	-
	99.Perzentile	239,6	1333,5
CD22PE	n	30	25
	1.Perzentile	-	13,9
	5.Perzentile	-	75,3
	10.Perzentile	-	116,2
	20.Perzentile	-	187,8
	Geometrisches Mittel (Spanne)	26,4 (6,6-129,9)	248,4* (159,8-336,8)
	90.Perzentile	58,2	-
	95.Perzentile	69,8	-
	99.Perzentile	97,6	729,8
CD79bFITC	n	30	25
	1.Perzentile	-	0,7
	5.Perzentile	-	2
	10.Perzentile	-	3,3
	20.Perzentile	-	5,8
	Geometrisches Mittel (Spanne)	1,6 (1,1-2,7)	13,1* (8,0-24,5)
	90.Perzentile	3,6	-
	95.Perzentile	4,7	-
	99.Perzentile	6,8	127,2
CD81FITC	n	30	25
	1.Perzentile	-	3,1
	5.Perzentile	-	5,9
	10.Perzentile	-	8,1
	20.Perzentile	-	11,2
	Geometrisches Mittel	6,9	20,2*
	90.Perzentile	14,2	-
	95.Perzentile	17	-
	99.Perzentile	24	115,7
* p < 0,0001, jeweils CLL vs. gesunde Referenzpopulation			

CD79bFITC/CD20PE/CD19PerCP-Cy5.5/CD5APC war die zweit-sensitivste Kombination ($3,1 \times 10^{-4}$). Dabei diskriminierte CD20PE besser zu den falsch positiven Zellen als CD79bFITC. Wenn beide Marker wie oben als niedrig definiert wurden, fielen pro 100.000 gemessener Leukozyten durchschnittlich 13,3 Zellen falsch in das CLL-Gate. Grenzte man näher an die benigne B-Lymphozyten-Population heran, indem als Grenze von CD20PE die 99. Perzentile zugrunde gelegt wurde, so verfünffachten sich die falsch positiven Ereignisse von durchschnittlich 42 auf 207,6 pro 100.000 gemessene Leukozyten. Mit CD79b kam es dabei zu einer Reduktion der Sensitivität um fast eine halbe logarithmische Stufe ($8,5 \times 10^{-4}$ vs. $3,1 \times 10^{-4}$).

Die Kombination von CD81FITC/CD22PE/CD19PerCP-Cy5.5/CD5APC erreichte eine Sensitivität von $7,8 \times 10^{-4}$. Dabei zeigte sich, dass CD81FITC in einigen CLL-Fällen aberrant hoch exprimiert wurde (s. Abb. 8) und somit in den Expressionsbereich der benignen Zellen fiel, so dass durchschnittlich 434,2 falsch positive Zellen, immer auf 100.000 gemessene Leukozyten bezogen, gemessen wurden. Kombiniert mit dem wesentlich stabileren Marker CD22PE, fielen im Durchschnitt nur noch 28,5 Zellen fälschlicher Weise in das CLL-Gate.

Die Sensitivitäten für die CLL-Kombinationen CD22/CD81 und für CD20/CD79b sind in der folgenden Tabelle 18 aufgelistet.

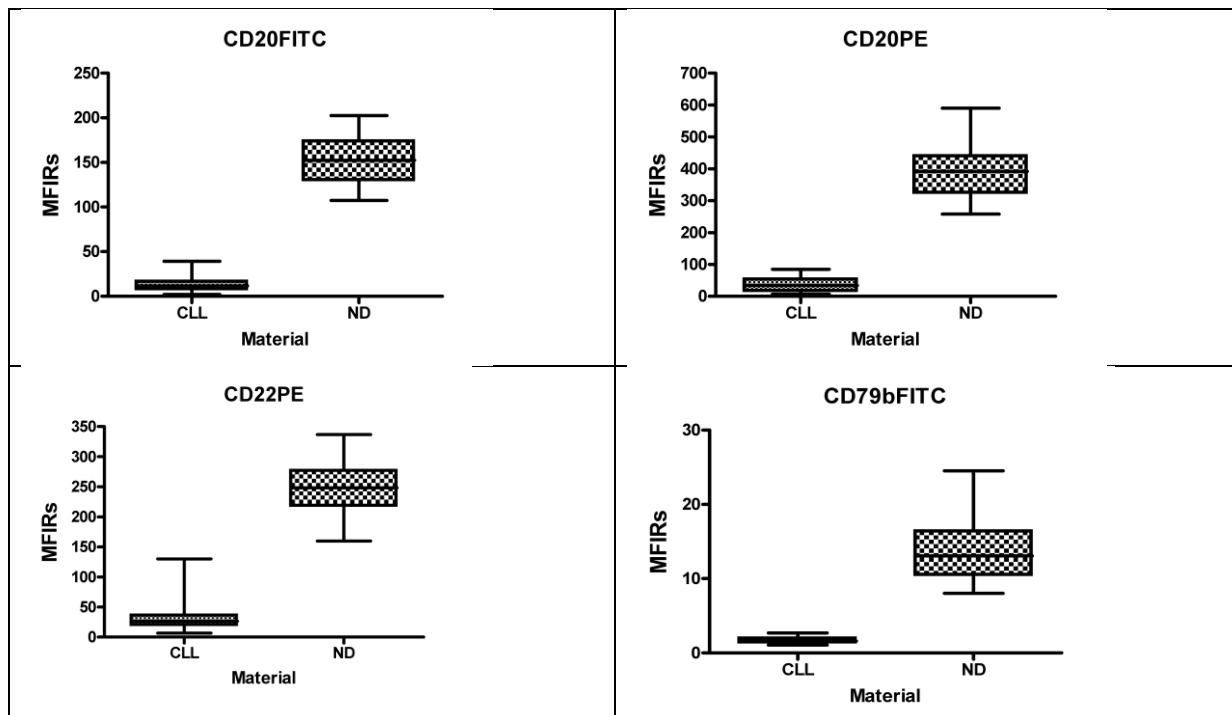
In der Abbildung 9 sind die gut diskriminierenden Oberflächenmarker CD20FITC/PE, CD22PE und CD79bFITC auf CLL gegen die Referenzpopulation aufgeführt.

Der typische CLL-Immunphänotyp entsprach $CD20^{\text{niedrig}}/CD22^{\text{niedrig}}/CD43^{+}/CD79b^{\text{niedrig}}/CD81^{\text{niedrig}}/CD5^{+}/CD19^{+}$.

Tab. 18: Immunphänotypische Abweichungen, Anwendbarkeit und Spezifität zum durchflusszytometrischen MRD-Nachweis bei CLL.

	Angewandte Gates auf CD5 ⁺ CD19 ⁺ -Lymphozyten					
	CD20 ^{niedrig}	CD22 ^{niedrig}	CD79b ^{niedrig}	CD81 ^{niedrig}	CD22 ^{niedrig} + CD81 ^{niedrig}	CD20 ^{niedrig} + CD79b ^{niedrig}
Erfasste CLL-Zellen in %	97	98	97	99	93	86
Median	7-100	70-100	28-100	22-100	19-100	6-100
Spanne						
% der CLL-Proben in denen						
95%	57	63	57	73	47	30
90%	73	77	67	80	60	40
85%	83	87	70	83	67	53
80%	83	90	70	83	73	53
75%	87	97	77	83	80	67
70%	87	100	80	87	87	70
65%	90	100	80	90	90	70
60%	90	100	87	90	90	80
der CLL-Zellen erfasst wurden						
% falsch positiver Ereignisse von allen gemessenen Leukozyten						
<u>Peripheres Blut:</u>						
Mittelwert	0,04	0,08	0,19	0,43	0,03	0,01
Mittelwert + 2 x Standardabweichung	0,13	0,18	0,41	0,93	0,08	0,03

Abb. 9: Signal-Rausch-Verhältnisse der geometrischen Mittelwerte (MFIR) von CD20FITC/PE,CD22PE und CD79bFITC auf CLL-Zellen und auf gesunden CD5⁺CD19⁺-Lymphozyten (ND)



Die Kastengraphik zeigt jeweils den Median, das obere und untere Quartil und die beiden Extremwerte an.

3.2.2.2 Anwendung der kreierten Auswertevorlagen anhand 30 zusätzlicher Blutproben unbehandelter CLL8-Patienten

Um herauszufinden, in wie vielen Fällen die starre Festlegung der „niedrig“-Marker auf die 95. Perzentile ausreichend die CLL erfassten, wurden nochmals 30 prätherapeutische CLL8-Blutproben untersucht. Dabei wurde der CLL^{95%}-Immunphänotyp in der standardisierten Methode mit den Regionen der 95. Perzentile beschrieben. CD79b^{95%}FITC/CD20^{95%}PE/CD19⁺PerCP-Cy5.5/CD5⁺APC und CD81^{95%}FITC/CD22^{95%}PE/CD19⁺PerCP-Cy5.5/CD5⁺APC.

Demgegenüber wurde der sichtbare CLL-Klon manuell markiert und als CLL^{manuell} bezeichnet. Als ausreichend erfasst galten die Proben, in denen mindestens 75 Prozent der wahren CLL-Population (CLL^{manuell}) als maligne markiert wurden.

Der CD79bFITC/CD20PE-95%-Ansatz erkannte die CLL in einem Drittel der Fälle nur ungenügend. In diesen Fällen wurden durchschnittlich nur 49 Prozent des sichtbaren Klons erfasst (6,24%-70,43% von CLL^{manuell}).

Dabei wurde CD20PE in 4 Fällen und CD79bFITC in 7 Fällen überexprimiert und nur in einem Fall wurden beide Antigene gemeinsam aberrant überexprimiert.

Der CD81FITC/CD22PE-95%-Ansatz erkannte in 6 Fällen nur durchschnittlich 50 Prozent der CLL und somit nicht ausreichend (18,51%-70,86%). Dabei stellte sich CD81FITC in 5 Fällen unkonstant überexprimierend dar, CD22PE nur in einem Fall.

Durch die interindividuelle Heterogenität der CLL führte eine vordefinierte MRD-Gatingstrategie zum Einschluss einer geringeren Zahl von CLL-Fällen als die traditionelle Methode, die die Krankheit als Immunphänotyp detektiert, der in der zweidimensionalen Auswertung Gesunder nicht vorkommt.

3.3 Vergleich der durchflusszytometrischen, histomorphologischen und molekularen MRD/MDD-Analysen

3.3.1 Initialdiagnostischer Vergleich der durchflusszytometrischen mit denen der Konsensus-IGH-FR1-PCR-Analyse und der Knochenmarkhistologie beim MCL

Es galt nun, die klinische Bedeutung der Vierfarben-FACS-Analyse in der Primärdiagnostik eines MCL zu ermitteln. Hierzu wurden 80 PB- und 30 KM-Proben von 84 zuvor unbehandelten Patienten durchflusszytometrisch, histologisch und molekulargenetisch untersucht. 88 der 110 Proben stammten von Patienten mit histologisch nachgewiesener Knochenmarkinfiltration.

Das FACS wies in 96 der 110 Proben (87,3%) MCL nach (86,7% in den KM-, 87,5% in den PB-Proben).

In der FACS-Analyse wurden MCL-Zellen in 67 Proben anhand einer LKR und dem aberranten Immunphänotyp erkannt, in 24 Proben nur anhand der monoklonalen LKR und in 5 Fällen ausschließlich anhand des aberranten Immunphänotyps.

Mittels der Konsensus-IGH-FR1-PCR wurde in 104 der 110 Fälle Monoklonalität nachgewiesen.

In zwölf Proben von Patienten, in deren Knochenmark histologisch kein MCL nachgewiesen wurde, waren mittels FACS-Analyse MCL-Zellen nachweisbar (10,9%; 11 PB, 1 KM). Dabei lag die mediane Infiltration bei $1,7 \times 10^{-2}$ Zellen (Spanne: $1,0 \times 10^{-1}$ bis $1,0 \times 10^{-3}$). Jeweils vier Patienten wurden in der Ann-Arbor-Klassifikation als Stadium II, III, IV eingestuft. Diese sensitiveren Ergebnisse der Durchflusszytometrie hätten somit bei acht der 84 Patienten (9,5%) zur Einstufung in ein höheres Befallsstadium geführt.

In drei Proben von zwei Patienten mit histomorphologischer Knochenmarkinfiltration zeigte die FACS-Untersuchung ein negatives Ergebnis. Von einem der zwei Patienten lag vom Diagnosezeitpunkt lediglich eine Blutprobe vor. In beiden Fällen wurde zwar der typische MCL-Immunphänotyp $CD22^{\text{niedrig}}CD23^{\text{niedrig}}CD5^{+}CD19^{\text{niedrig}}$ nachgewiesen, jedoch bei unklarer LKR. Durch den geringgradigen Befall ($1,2 \times 10^{-4}$, $3,9 \times 10^{-4}$, $6,9 \times 10^{-4}$), der jeweils unter der ermittelten Nachweisgrenze dieses FACS-Ansatzes lag, wurden diese drei Proben als negativ bewertet. In der Konsensus-IGH-FR1-PCR waren diese Proben positiv.

Die Blutprobe eines Patienten mit histologisch nachgewiesener Knochenmarkinfiltration wurde im FACS negativ befundet, obwohl das zugehörige Knochenmarkaspirat einen durchflusszytometrisch nachweisbaren Befall aufwies.

Diese Vergleichsuntersuchungen belegten, dass standardisierte durchflusszytometrische MRD-Analysen in einem klinisch bedeutsamen Anteil ein höheres Ausbreitungsstadium des MCL als die Histologie nachweisen können. Konsensus IGH-PCR detektierte MCL häufiger als die Durchflusszytometrie.

Tab. 19: Ergebnisse der FACS Analyse in Abhängigkeit vom histologisch nachgewiesenem Knochenmarkbefall und dem Ergebnis der Konsensus IGH-FR1-PCR.

Initialdiagnose (n = 110)	FACS+	FACS-
Knochenmarkhistologie +	84 (76,4%)	4 (3,6 %)
Knochenmarkhistologie -	12 (10,9 %)	10 (9,1 %)
PCR +	95 (86,4 %)	9 (8,2 %)
PCR -	1* (0,9%)	5 (4,5%)

* diese Probe war positiv in der t(11;14) PCR

3.3.2 Vergleich der durchflusszytometrischen MRD-Ergebnisse der MCL-Verlaufsproben mit denen der Konsensus-IGH-FR1-PCR

Untersucht wurden 171 Verlaufsproben (53 aus dem Knochenmark, 118 aus dem peripheren Blut) von 67 Patienten. Dabei wurden 134 Proben während oder direkt nach der Induktionstherapie (Interim- bzw. Final Staging) entnommen. 23 Proben aus der Nachbeobachtungszeit (follow-up), mit einer maximalen Nachbeobachtungszeit von 8 Monaten und 14 Proben von Patienten, die eine Erhaltungstherapie erhielten.

Die Mehrzahl aller Proben während oder unmittelbar nach der Induktionstherapie waren im FACS sowie in der Konsensus-IGH-FR1-PCR MRD-negativ (76,0%). In zehn Proben von zehn Patienten wurden im FACS und in der PCR MCL nachgewiesen. Dabei konnten acht Proben mittels des MCL-Immunphänotyps und der LKR identifiziert werden, eine Probe nur mittels der LKR und eine Probe nur anhand des Immunphänotyps. Das mediane MRD-Niveau lag bei 1×10^{-2} Zellen, was im Median 41 Zellen pro μl entsprach (14- 8200 Zellen/ μl).

In 31 der 171 untersuchten Proben (18,1%) konnte in der PCR ein monoklonales Signal nachgewiesen werden, in denen die FACS-Kriterien einer minimalen Resterkrankung nicht gegeben waren. Aufgeschlüsselt waren es 9 Knochenmarkproben und 22 Blutproben von 22 Patienten, die alle bis auf eine Probe während oder direkt nach der Induktionstherapie entnommen wurden. In diesen 31 PCR+/FACS- Proben wurden im Median 88.563 Leukozyten pro Röhrchen gemessen. In 16 dieser Proben (51,6%) konnte eine suspekte B-Zell-Population erkannt werden, während in den 15 anderen Proben keine B-Lymphozyten nachweisbar waren. Der mediane B-Lymphozyten-Gehalt lag somit lediglich bei $6,5 \times 10^{-4}$ (von $1,3 \times 10^{-4}$ bis $1,4 \times 10^{-1}$) selbst in den Proben mit erkennbarer B-Lymphozyten-Population. Die Daten zeigten bei den meisten MCL-Patienten, dass die Immunchemotherapie mit Rituximab neben der erwünschten Reduzierung des MCL zu einer starken B-Lymphozytopenie führte. In dieser Phase der Therapie zeigte die PCR eine deutlich höhere Sensitivität als die Vierfarben-Durchflusszytometrie.

3.3.3 Vergleich der FACS-MRD-Ergebnisse zwischen Knochenmarkproben und entsprechender Proben aus dem peripheren Blut bei MCL-Patienten

Von 45 Patienten lagen 74 Knochenmarkproben zu den entsprechenden Blutproben zur parallelen Untersuchung vor (26 zum Diagnosezeitpunkt, 48 Verlaufsproben). 22 gepaarte Proben waren im Blut sowie im Knochenmark MCL positiv, 5 Paare waren nur in der Knochenmarkprobe positiv und negativ im Blut, während in 47 gepaarten Proben weder im

KM noch im Blut MCL nachgewiesen werden konnten.

Betrachtet man nur die gepaarten Proben aus dem prätherapeutischen Staging erhielt man vergleichbare Ergebnisse für Blut und Knochenmark. 3/26 (11,5%) sind gleichzeitig negativ für MCL, 21/26 (80,8%) sind in den beiden korrespondierenden Proben positiv und 2/26 (7,7%) waren nicht leukämisch, jedoch knochenmarkinfiltriert.

Leukämische MCL ohne Knochenmarkbeteiligung wurden nie beobachtet. In den Knochenmarkproben, in denen ein positiver MCL-Nachweis in der entsprechenden Blutprobe gelang, zeigte sich eine positive quantitative Korrelation des Infiltrationsgrades in beiden Materialien ($r=0,77$; $p<0,0001$). Zeigte sich durchflusszytometrisch ein Anhalt für MCL-Infiltration im Knochenmark und war die zugehörige Blutprobe negativ, lag ein quantitativ sehr geringer Infiltrationsgrad im Knochenmark vor ($7,9 \times 10^{-4}$ und $9,8 \times 10^{-2}$ Zellen).

Im prätherapeutischen Material zeigte die Arbeit eine hohe Übereinstimmung des Befalls zwischen Knochenmark und Blut.

3.3.4 Vergleichende Verlaufsanalysen zwischen MRD-FACS und der IGH-RQ-PCR bei Patienten der CLL8-Studie

Um das MRD-FACS als valides Instrument im therapeutischen Verlauf eines Patienten zu etablieren, wurden 67 Verlaufsproben von 11 FC-behandelten CLL8-Patienten (im Mittel 6 Proben/Patient), mittels MRD-FACS sowie mit der molekularen Referenzmethode IGH-RQ-PCR untersucht.

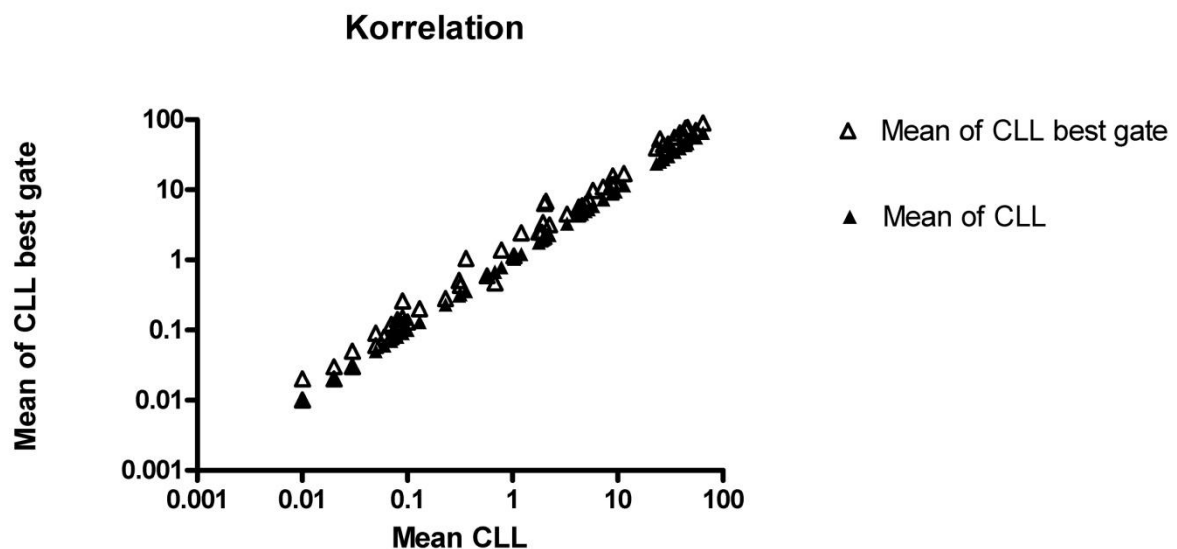
Dabei korrelierten die Ergebnisse beider Methoden im MRD-Verlaufsmonitoring hochsignifikant ($p < 0,0001$, s. Tab. 20).

Auch zwischen der von uns oben beschriebenen standardisierten Auswertestrategie und der nach der individuellen Erfahrung geleiteten FACS-Auswertung zeigte sich eine signifikante Korrelation zu den molekulargenetischen MRD-Ergebnissen ($p < 0,0001$, siehe Abbildung 10).

Tab. 20: Vergleichende RQ-PCR und FACS Untersuchungsergebnisse der Verlaufsanalysen bei der CLL

Verlaufsproben (n = 67)	FACS+	FACS-
RQ-PCR +	34 (50,7 %)	5 (7,5 %)
RQ-PCR -	0 (0,0 %)	28 (41,8 %)

Abb. 10: Graphische Darstellung der Korrelationsanalysen zwischen den CLL-MRD-Ergebnissen der standardisierten Auswertestrategie (Mean CLL) und der individuellen Auswertung (Mean of CLL best gate) jeweils in Prozent.



4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war, neue durchflusszytometrische Methoden zur Quantifizierung einer minimalen Tumorzellinfiltration bei Diagnosestellung und im Therapieverlauf (MRD-FACS) bei dem MCL und bei der B-CLL zu etablieren.

Zusätzlich sollte die Sensitivität und Spezifität der FACS-Panels durch den Vergleich mit molekularen MRD-Messungen ermittelt werden.

Für das MCL wurden bislang nur wenige Zwei- oder Dreifarben-Durchflusszytometrie-Studien mit kleinen Fallzahlen durchgeführt [34, 49]. Bisher wurde der MCL-Immunphänotyp dabei folgendermaßen beschrieben: $CD5^+$, $CD19^{\text{niedrig}}$, $CD23^{\text{niedrig}}$, $CD22^{\text{niedrig}}$, $CD79b^{\text{hoch}}$ und LKR^+ [34, 49, 53]. Anhand einer klar definierten MCL-Referenzgruppe von Patienten des Europäischen Mantelzelllymphom-Netzwerks (EU-MCL-Network) mit sicher nachgewiesener LKR und t(11;14) Translokation wurde die durchschnittliche Expressionstärke von CD22, CD23 und CD79b auf den $CD5^+CD19^{\text{niedrig}}$ -MCL-Zellen ermittelt.

Diese Arbeit quantifizierte die Expressionsniveaus von CD22/CD23 beziehungsweise von CD22/CD79b auf den $CD5^+CD19^+$ -Subpopulationen. Es konnte bestätigt werden, dass $CD22^{\text{niedrig}}CD23^{\text{niedrig}}CD5^+CD19^{\text{niedrig}}$ ein stabiler und typischer Immunphänotyp bei MCL ist. Allerdings fanden sich auch einige Fälle CD5-negativer MCL, wie von Liu et al bereits beschrieben [54].

Im Gegensatz zu den Beobachtungen von D'Arena et al [49] wurde in der vorgelegten Arbeit eine CD79b-Überexpression nur in 5% der MCL-Proben nachgewiesen (D'Arena et al.: 100% bei 10 MCL-Proben). In den meisten MCL-Proben (65%) wurde CD79b deutlich unterexprimiert, in 30% eine gegenüber benignen B-Zellen unveränderte CD79b-Expression gemessen. Vor dem Hintergrund einer klar definierten pathognomonischen Translokation t(11;14) erscheint eine derartige Variabilität der CD79b-Expression ungewöhnlich.

Neben der inhomogenen CD79b-Expression finden sich auch Überlappungen in der mittleren Expressionsstärke von CD22PE und CD23FITC zwischen MCL- und nicht malignen B-Lymphozyten.

Zusätzlich erscheint auch eine therapiebedingte Modulation der Expression einzelner Oberflächenantigene möglich, wie es Gaipa et al für die kindliche Akute Lymphatische Leukämie beschrieben haben [55]. Auch bei zwei der von uns untersuchten MCL-Patienten war eine bei Diagnosestellung eindeutig nachweisbare LKR der MCL-Zellen unter Induktionstherapie nicht mehr detektierbar (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund dieser Phänomene sowie der teils unzureichenden Trennbarkeit maligner und benigner Zellen durch die Analyse einzelner Antigene wurde die Kombination mehrerer Marker und eine klare Definition von „Unterexpression“ unumgänglich.

In diesem Definitionsversuch wurden nicht nur die unterschiedlichen mittleren Expressionsstärken (MFI) zwischen den verschiedenen Proben untersucht, sondern auch die Verteilung der Fluoreszenzintensitäten der MCL-Zellen innerhalb einer Probe. Dafür wurde der empirisch festgelegte MFIR^{95%}-Wert für CD22, CD23 und CD79b mit dem MFI der jeweiligen Isotypkontrolle jeder einzelnen Probe multipliziert, um das Expressionsniveau dieser Antigene festzulegen. Wendet man diese standardisierte Gatingstrategie auf Kontrollproben gesunder Probanden an, errechnete sich eine Sensitivität von $2,4 \times 10^{-3}$ für den CD23^{niedrig}CD22^{niedrig}CD5⁺CD19^{niedrig}-Ansatz, MCL-Zellen zu detektieren. Unter der Maßgabe, dass mindestens 75% der MCL-Zellen erkannt werden müssen, ließ sich dieser Ansatz nur in 79% aller untersuchten MCL-Proben anwenden.

Eine striktere Begrenzung auf die 90. Perzentile der mittleren Expression auf MCL-Zellen (MFIR^{90%}) hätte die Spezifität des Ansatzes zwar erhöht, jedoch die Sensitivität weiter negativ beeinflusst. Umgekehrt hätte eine Annäherung der „Unterexpressionsgrenze“ an die benignen B-Zellen durch die teils deutliche Überlappung beider Populationen den positiven prädiktiven Wert deutlich erniedrigt. Somit stellte die Festlegung auf die 95. Perzentile den besten Kompromiss dar.

Da diese Gatingstrategie nicht auf alle MCL-Patienten anwendbar ist, sollte bei der MRD-Untersuchung der initiale Immunphänotyp zusammen mit der sensitiveren LKR bekannt sein, um atypische MCL-Fälle individuell auszuwerten zu können.

Ein Beispiel ist die bimodale Verteilung von CD79b auf MCL-Zellen. In dem CD79b^{niedrig/+hoch}CD22^{niedrig}CD5⁺CD19^{niedrig}-Ansatz muss CD79b nach dem initialen Immunphänotyp entweder als „niedrig“- oder „hoch“-Marker eingesetzt werden.

In der Veröffentlichung von Böttcher et al [56], wurde gezeigt, dass die LKR-Untersuchung der CD5⁺CD19^{niedrig}-Lymphozyten-Subpopulation eine sensitive Methode zur MCL-Detektion darstellt. Die monoklonale LKR als eine typische Eigenschaft von Lymphomzellen und die gerade bei MCL-Zellen niedrige CD19-Expression lässt eine gute Unterscheidung zu benignen B-Lymphozyten zu. Die Sensitivität der LKR-Untersuchung wird insofern im Wesentlichen durch die Anzahl der gemessenen Leukozyten begrenzt. Es muss eine minimale Zellzahl im definierten Gate gemessen werden, um eine positive Population von verstreuten Zellen, T-Lymphozyten oder Zelldebris unterscheiden zu können. Die minimale Zellzahl zur Bildung eines Clusters liegt bei 20-50 Zellen.

Die maximale Sensitivität der LKR-Untersuchung in dieser Studie liegt bei $7,9 \times 10^{-4}$ [56] und liegt damit bei den MCL wesentlich höher, als für die CLL beschrieben [35]. Diese Beobachtungen hängen mit dem typischen Immunphänotyp $CD5^+CD19^{\text{niedrig}}$ der MCL-Zellen und deren hochgradiger Leichtkettenexpression zusammen. Durch die höhere Sensitivität und die breitere Anwendbarkeit gegenüber der Analyse aberranter Immunphänotypen ist die LKR-Untersuchung als überlegen anzusehen. Bei zweifelhafter oder fehlender LKR sollte der alleinige Nachweis des aberranten Immunphänotyp nur ergänzende Auskünfte über eine mögliche MRD liefern.

Die Spezifität der durchflusszytometrischen MRD-Untersuchungen beim MCL wurde in dieser Arbeit anhand der parallelen Konsensus-IGH-FR1-PCR-Untersuchungen überprüft. Bis auf eine MCL-Probe, die in den Verlaufsproben-Untersuchungen im FACS positiv und in der PCR negativ gemessen wurde (FACS+/PCR-), waren alle FACS positiven Proben auch in der PCR positiv. Die einzige FACS+/PCR- Probe zeigte in der PCR der t(11;14) ein spezifisches Signal, so dass insgesamt von einer hohen Spezifität der FACS-Analyse auszugehen ist (s. Tab. 19).

Die Sensitivität der Konsensus-IGH-FR1-PCR hängt im Wesentlichen von der Größe des klonalen Amplifikats in Relation zur Größe der polyklonalen PCR-Produkte sowie der Anzahl der polyklonalen B-Lymphozyten in der Probe ab. Zudem kann die PCR beispielsweise durch Mutationen an der Bindungsstelle des Primers zu falsch negativen Ergebnissen führen. Allerdings werden Mutationen innerhalb von IGH-Rearrangements im Wesentlichen bei Keimzentrums- und Post-Keimzentrumslymphomen beobachtet.

Auffällig ist der hohe Anteil an FACS-/PCR+ Ergebnissen (18,1%) der follow-up-Proben. Ein entscheidender Punkt scheint die Anwendung von Rituximab in den Induktionsprotokollen zu sein. Dieses führt nicht nur zu einer starken Reduktion der MCL-Zellen, sondern auch der benignen B-Lymphozyten. In diesen Proben lag die absolute Zahl der gemessenen B-Lymphozyten oftmals unter der absoluten Nachweisgrenze zur Definition einer Population im FACS-Ansatz. Dagegen ist die hohe Erkennungsrate der Konsensus-IGH-FR1-PCR vor dem Hintergrund der effizienten Eliminierung polyklonaler B-Lymphozyten erklärbar. Hinzu kommt, dass die PCR auch die DNA apoptotischer Zellen amplifizieren kann, während die Durchflusszytometrie nur intakte Zellen erfasst.

Des Weiteren wurde in der vorgelegten Arbeit gezeigt, dass die Vierfarben-Durchflusszytometrie und die Konsensus-IGH-FR1-PCR den initialen MCL-Befall sensitiver als die Knochenmarkhistologie, erfasst. Bei Patienten mit histologisch unauffälligem Knochenmark wurden im MRD-FACS deutlich niedrigere Infiltrationsraten erfasst, als in

Proben mit histologischem Lymphomnachweis. Diese Beobachtungen legen eine höhere Sensitivität des FACS gegenüber der Knochenmarkhistologie nahe. Allerdings wurden histomorphologische Befunde im Rahmen der Routinediagnostik durch verschiedene pathologische Institute erhoben. Somit ist nicht auszuschließen, dass eine standardisierte Referenzhistologie sowie zusätzliche einheitliche immunhistochemische Färbungen die histomorphologischen Erfassungsraten erhöht hätten.

Die Einbeziehung der durchflusszytometrischen Ergebnisse hätte bei ca. 10% aller untersuchten MCL-Patienten zu einer Hochstufung in das Stadium IV nach Ann Arbor geführt. Weitere 6% der Patienten wären durch Anwendung der Konsensus-IGH-FR1-PCR in ein generalisiertes Stadium gestuft worden. Aufgrund der prognostischen Relevanz des Ausbreitungsstadiums sollte in prospektiven Studien die Bedeutung einer nur durchflusszytometrisch beziehungsweise molekulargenetisch nachweisbaren KM-Beteiligung bzw. Ausschwemmung evaluiert werden.

Zudem könnten diese sensitiven Methoden eine klinische Bedeutung erlangen für Patienten mit lokalisiertem Befall indolenter Lymphome. Vor der Entscheidung bezüglich einer lokalen, potentiell kurativen Strahlentherapie wäre möglicherweise ein Ausschluss beziehungsweise der Nachweis einer Systemerkrankung bedeutsam.

Weiterhin konnte in der vorgelegten Arbeit gezeigt werden, dass Patienten mit einer durchflusszytometrisch nachgewiesenen Knochenmarkinfiltration durch ein MCL auch leukämisch ausschwemmen. Somit könnte bei Patienten mit nachweisbarer Ausschwemmung des MCL auf die invasive diagnostische KM-Untersuchung verzichtet werden. Bei sehr niedrigem MRD-Niveau im Knochenmark ($<0,09\%$) ließ sich allerdings in der korrespondierenden Blutprobe keine Ausschwemmung nachweisen.

Für die CLL wurden bereits verschiedene durchflusszytometrische MRD-Panels etabliert. [23, 30, 35, 57]. Dabei wurde der CLL-Immunphänotyp bisher folgendermaßen beschrieben. $CD19^+$, $CD5^+$, $CD20^{\text{niedrig}}$, $CD22^{\text{niedrig}}$, $CD23^+$, $CD43^+$, $CD79b^{-/\text{niedrig}}$, $CD81^{\text{niedrig}}$ und LKR-Nachweis [9, 23, 30, 35, 57].

Um die Trennschärfe der einzelnen Marker beurteilen zu können, wurden in der vorgelegten Arbeit die durchschnittlichen Expressionsstärken von CD20, CD22, CD79b und CD81 auf CLL-Zellen und reifen B-Lymphozyten untersucht. Gemessen wurden die immunphänotypischen Expressionsunterschiede von CD20/CD79b und CD81/CD22 auf den $CD5^+CD19^+$ -Subpopulationen. Die Sensitivität dieser beiden Antikörper-Ansätze sowie der von Böttcher et al. beschriebenen Antikörperkombination CD20/CD5/CD19/CD43 [23]

wurde anhand der gesunden Referenzgruppe errechnet. Erneut fand die oben beschriebene Auswertestrategie Anwendung. Das Panel von Böttcher et al. erwies sich als sensitivster Ansatz mit einer maximalen Sensitivität von $1,3 \times 10^{-4}$. Interessant in diesem Zusammenhang war die offensichtliche Bedeutung der Wahl der verwendeten CD20-Fluorochroms. CD20FITC führte zu einer gegenüber CD20PE fast um eine log-Stufe erhöhten Sensitivität der Analyse (CD20FITC: $2,3 \times 10^{-4}$ versus CD20PE: $1,3 \times 10^{-3}$). Bekannt ist das wesentlich höhere Signal-Rausch-Verhältnis von PE gegenüber FITC. Das führt möglicherweise zu einer Reduktion des messbaren Unterschieds zwischen den CD20 niedrig exprimierenden CLL-Zellen und den CD20 hoch exprimierenden benignen B-Lymphozyten. Insgesamt bestätigte sich die hohe Bedeutung von CD20 für die Sensitivität beider Ansätze. Allerdings ergeben sich hieraus diagnostische Probleme für die MRD-Untersuchungen nach Gabe von Rituximab-haltigen Therapieprotokollen. Auch die Anfärbung intrazytoplasmatischer Anteile von CD20 scheint dieses Problem nicht zu umgehen, da bereits wenige Stunden nach Rituximabgabe auch hier eine dramatische Reduktion des spezifischen Signals auf CLL-Zellen zu beobachten ist (S. Böttcher, unveröffentlichte Analysen). Aktuelle Protein-Expressionsanalysen von Rawstron et al [38] zeigen, dass die Kombination mit CD81/CD22/CD19/CD5 eine spezifische Alternative zu den CD20-Kombinationen in der MRD-Diagnostik ist. Dieses wurde in der vorgelegten Arbeit bestätigt. Mit diesem Panel wurde eine Sensitivität von $7,8 \times 10^{-4}$ erreicht und somit eine halbe log-Stufe niedriger als in den CD20-haltigen Panels.

Neben der Blockierung von CD20 durch den therapeutischen Antikörper können auch eine aberrant hohe Expression von CD20 auf CLL-Zellen oder andere untypische Proteinexpressionsprofile problematisch sein. Als sogenannte „atypische“ CLL wird eine CLL beschrieben, deren Immunphänotyp teilweise vom typischen Immunphänotyp abweicht. Dieses stellt ein weiteres Problem für die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten rigiden Auswertestrategie dar.

Für die untersuchten Antikörper-Kombinationen können aberrant hohe Expressionen von CD20, CD22 und CD79b relevant werden. Es zeigten sich für diese Antigene in den Expressionsanalysen zwar keine Überlappungen zu den B-Lymphozyten der gesunden Referenzgruppe, allerdings führten relative Überexpressionen von CD20 und CD79b in einem Drittel der 30 untersuchten CLL-Fälle zu einem Versagen der Auswertestrategie. Allerdings waren nur in 1/10 Fällen beide Marker gleichzeitig hoch exprimiert, in 9/10 Fällen hingegen nur CD20 oder CD79b überexprimiert waren.

Weiterhin wurde durch die vorgelegte Arbeit die geringe Bedeutung von CD43⁺ bestätigt. Eine Dreifarbenanalyse unter Exklusion von CD43 führte zu einer Sensitivität von $2,3 \times 10^{-4}$. Jedoch erreichte auch ein von Rawstron et al. 2001 publiziertes Panel, welches CD79b statt CD43 einsetzte, keine höhere Sensitivität. Eine mögliche Erklärung ist, dass Rawstron einen PE-markierten CD20-Antikörperklon verwendete.

CD81 war der einzige Marker, der eine Überlappung in der Expression zwischen der CLL und den gesunden B-Lymphozyten aufwies. Teilweise erschien auch CD81 „atypisch“ hoch exprimiert. In 5 von 30 Fällen wurde der CLL-Klon durch eine solche atypische CD81-Überexpression nur unzureichend erfasst.

CD22 erschien dagegen als stabil exprimierter CLL-Marker (nur in einem von 30 Fällen überexprimiert), mit einer guten Diskrimination zu benignen B-Lymphozyten. In einer Dreifarben-Kombination erreichte CD22 eine Sensitivität von $1,8 \times 10^{-3}$, mit durchschnittlich 76,8 falsch positiven Ereignissen pro 100.000 gemessene Leukozyten, im Vergleich zu 193,6 Ereignissen bei Verwendung von CD79b und 434,2 Ereignissen mit CD81.

Dennoch zeigte sich in den vergleichenden MRD-Analysen sowohl für den standardisierten MRD-FACS-Ansatz als auch für die freie Gating-Strategie eine gute Korrelation der quantitativen MRD-Ergebnisse zur molekularen Referenzmethode. Zudem erwies sich die FACS-MRD-Analyse als hochspezifisch.

Ein Vorteil der Durchflusszytometrie gegenüber der Molekulargenetik ist die rasche Verfügbarkeit der Ergebnisse sowie die simultane Erfassung weiterer Charakteristika maligner und benigner Zellen. Eine standardisierte Auswertestrategie erscheint hierbei, auch wenn sie mit einigen Limitierungen verbunden ist, eine Möglichkeit, Ergebnisse der FACS-MRD-Diagnostik vergleichbarer zu machen und die Analysen expertenunabhängiger zu gestalten.

5. Zusammenfassung

Die Möglichkeiten zur Behandlung des MCL's und der CLL haben sich in den letzten Jahren deutlich verbessert. Der Anteil der Komplettremissionen konnte insbesondere durch Einsatz moderner Immunchemotherapieprotokolle gesteigert werden. Allerdings stellen auch diese Therapien keine kurative Behandlungsoption dar, da sie zu keiner kompletten Elimination der Tumorzellen führen. Somit muss auch bei Patienten, die nach klassischen Kriterien eine Vollremission erreichen, von einer submikroskopischen Persistenz von Tumorzellen ausgegangen werden, die Ausgangspunkt für spätere Rezidive darstellen. Diese sogenannte "minimal residual disease" (MRD) hat neben konventionellen Risikofaktoren eine entscheidende Bedeutung für die Prognose und möglicherweise für das diagnostische und therapeutische Management von Patienten mit MCL oder CLL.

In der vorgelegten Arbeit wurde die Mehr-Farben-Durchflusszytometrie zum MRD-Nachweis bei MCL und CLL im Vergleich zu sensitiven molekulargenetischen Verfahren getestet. Die Durchflusszytometrie nutzt aberrante Antigenexpressionen der Lymphomzellen, um maligne von benignen Zellen zu unterscheiden und ermöglicht so eine schnelle und quantitative MRD-Analyse. Im Rahmen der Dissertation wurden Expressionsunterschiede definierter Antigene zwischen Lymphomzellen und benignen B-Lymphozyten gesunder Spender analysiert. Zudem wurden standardisierte Kriterien zum Nachweis von MCL- und CLL-Zellen mittels 4-Farben-Durchflusszytometrie entwickelt und Markerkombinationen auf ihre Sensitivität, Spezifität und Anwendbarkeit zum MRD-Nachweis untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass 4-Farben-FACS und Konsensus-IGH-FR1-PCR MCL-Zellen bei Diagnosestellung sensitiver detektieren als die Knochenmarkhistologie. Es wurde bestätigt, dass $CD5^+CD19^{niedrig}CD22^{niedrig}CD23^{niedrig}$ ein typischer Immunphänotyp bei MCL ist. Allerdings wurde die Sensitivität der FACS-Analyse durch überlappende Expressionsniveaus zwischen MCL-Zellen und gesunden B-Lymphozyten reduziert. Wendet man die in dieser Arbeit beschriebene standardisierte Auswertungsstrategie für MCL-Zellen an, erreicht dieser Ansatz eine maximale Sensitivität von $2,6 \times 10^{-3}$.

Bei der CLL wurde $CD5^+CD19^+CD22^{niedrig}CD81^{niedrig}$ als "CD20"-freier Immunphänotyp bestätigt und nach der standardisierten Auswertungsstrategie CLL-Zellen bis zu einer Sensitivität von $7,8 \times 10^{-4}$ detektiert. Die Anwendbarkeit und die Korrelation zur molekularen Referenzmethode waren zur Diagnostik sowie in der MRD-Verlaufsanalyse gut.

Zusammenfassend ist die Durchflusszytometrie eine sensitive Methode für das initiale MCL-Staging. Ein Nachweis von leukämischen MCL könnte für eine große Anzahl von Patienten

eine diagnostische Knochenmarkpunktion überflüssig machen. Zudem können niedrige Knochenmarkinfiltrationen, die unter der Nachweisgrenze der Knochenmarkzytologie liegen, mittels FACS gesichert werden. Dieses führt zur häufigeren Diagnose eines generalisierten Ausbreitungsstadiums mit möglichen Konsequenzen für Therapie und Prognose.

Die 4-Farben-FACS-Analyse ist zur MRD-Detektion von MCL-Zellen nach Rituximab Therapie der Molekulargenetik unterlegen. Auch bei der CLL weist die molekulare Referenzmethode eine gegenüber der FACS-Analyse höhere Sensitivität auf.

6. Literaturverzeichnis

1. Lennert, K., H. Stein, and E. Kaiserling, *Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphomata*. Br J Cancer Suppl, 1975. 2: p. 29-43.
2. Delsol, G., [The 2008 WHO lymphoma classification]. Ann Pathol, 2008. 28 Spec No 1(1): p. S20-4.
3. Perez-Galan, P., M. Dreyling, and A. Wiestner, *Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era*. Blood, 2011. 117(1):p. 26-38.
4. Herrmann, A., et al., *Improvement of overall survival in advanced stage mantle cell lymphoma*. J Clin Oncol, 2009. 27(4): p. 511-8.
5. Metzner, B., et al., *Long-term clinical and molecular remissions in patients with mantle cell lymphoma following high-dose therapy and autologous stem cell transplantation*. Ann Hematol, 2013..
6. Dreyling, M., et al., *Early consolidation by myeloablative radiochemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in first remission significantly prolongs progression-free survival in mantle-cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the European MCL Network*. Blood, 2005. 105(7): p. 2677-84.
7. Mauro, F.R., et al., *Clinical features and outcome of familial chronic lymphocytic leukemia*. Haematologica, 2006. 91(8): p. 1117-20.
8. Rawstron, A.C., *Prevalence and characteristics of monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL) in healthy individuals and the relationship with clinical disease*. J Biol Regul Homeost Agents, 2004. 18(2): p. 155-60.
9. Hallek, M., et al., *Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines*. Blood, 2008. 111(12): p. 5446-56.
10. Ritgen, M., et al., *Unmutated immunoglobulin variable heavy-chain gene status remains an adverse prognostic factor after autologous stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2003. 101(5): p. 2049-53.
11. Stilgenbauer, S., et al., *Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course*. Leukemia, 2002. 16(6): p. 993-1007.
12. Stilgenbauer, S. and H. Dohner, *Genotypic prognostic markers*. Curr Top Microbiol Immunol, 2005. 294: p. 147-64.

13. Dohner, H., et al., *Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med, 2000. 343(26): p. 1910-6.
14. Eichhorst, B.F., et al., *Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2006. 107(3): p. 885-91.
15. O'Brien, S.M., et al., *Alemtuzumab as treatment for residual disease after chemotherapy in patients with chronic lymphocytic leukemia*. Cancer, 2003. 98(12): p. 2657-63.
16. Hallek, M., et al., *Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial*. Lancet, 2010. 376(9747): p. 1164-74.
17. Hallek, M., *State-of-the-art treatment of chronic lymphocytic leukemia*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2009: p. 440-9.
18. Stilgenbauer, S., et al., *Subcutaneous alemtuzumab in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia: clinical results and prognostic marker analyses from the CLL2H study of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group*. J Clin Oncol, 2009. 27(24): p. 3994-4001.
19. Wendtner, C.M., et al., *Consolidation with alemtuzumab in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) in first remission--experience on safety and efficacy within a randomized multicenter phase III trial of the German CLL Study Group (GCLLSG)*. Leukemia, 2004. 18(6): p. 1093-101.
20. Dreger, P., et al., *Allogeneic stem cell transplantation provides durable disease control in poor-risk chronic lymphocytic leukemia: long-term clinical and MRD results of the GCLLSG CLL3X trial*. Blood, 2010. 116(14): p. 2438-2447.
21. Dreger, P., *Allotransplantation for chronic lymphocytic leukemia*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2009: p. 602-9.
22. Schetelig, J., et al., *Evidence of a graft-versus-leukemia effect in chronic lymphocytic leukemia after reduced-intensity conditioning and allogeneic stem-cell transplantation: the Cooperative German Transplant Study Group*. J Clin Oncol, 2003. 21(14): p. 2747-53.
23. Bottcher, S., et al., *Comparative analysis of minimal residual disease detection using four-color flow cytometry, consensus IgH-PCR, and quantitative IgH PCR in CLL after allogeneic and autologous stem cell transplantation*. Leukemia, 2004. 18(10): p. 1637-45.

24. Linke, B., et al., *Automated high resolution PCR fragment analysis for identification of clonally rearranged immunoglobulin heavy chain genes*. Leukemia, 1997. 11(7): p. 1055-62.
25. Aubin, J., et al., *Description of a novel FR1 IgH PCR strategy and its comparison with three other strategies for the detection of clonality in B cell malignancies*. Leukemia, 1995. 9(3): p. 471-9.
26. Bruggemann, M., et al., *Improved assessment of minimal residual disease in B cell malignancies using fluorogenic consensus probes for real-time quantitative PCR*. Leukemia, 2000. 14(8): p. 1419-25.
27. van der Velden, V.H., et al., *Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects*. Leukemia, 2003. 17(6): p. 1013-34.
28. van der Velden, V.H., et al., *Optimization of PCR-based minimal residual disease diagnostics for childhood acute lymphoblastic leukemia in a multi-center setting*. Leukemia, 2007. 21(4): p. 706-13.
29. van Dongen, J.J., et al., *Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936*. Leukemia, 2003. 17(12): p. 2257-317.
30. Rawstron, A.C., et al., *International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia*. Leukemia, 2007. 21(5): p. 956-64.
31. Rawstron, A.C., *Monoclonal B-cell lymphocytosis*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2009: p. 430-9.
32. Vidriales, M.B., et al., *Minimal residual disease monitoring by flow cytometry*. Best Pract Res Clin Haematol, 2003. 16(4): p. 599-612.
33. Craig, F.E. and K.A. Foon, *Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms*. Blood, 2008. 111(8): p. 3941-67.
34. Sanchez, M.L., et al., *Incidence of phenotypic aberrations in a series of 467 patients with B chronic lymphoproliferative disorders: basis for the design of specific four-color stainings to be used for minimal residual disease investigation*. Leukemia, 2002. 16(8): p. 1460-9.
35. Rawstron, A.C., et al., *Quantitation of minimal disease levels in chronic lymphocytic leukemia using a sensitive flow cytometric assay improves the prediction of outcome*

- and can be used to optimize therapy. Blood*, 2001. 98(1): p. 29-35.
36. Deneys, V., et al., *Reference values for peripheral blood B-lymphocyte subpopulations: a basis for multiparametric immunophenotyping of abnormal lymphocytes. J Immunol Methods*, 2001. 253(1-2): p. 23-36.
 37. Bomberger, C., et al., *Lymphoid reconstitution after autologous PBSC transplantation with FACS-sorted CD34+ hematopoietic progenitors. Blood*, 1998. 91(7): p. 2588-600.
 38. Rawstron, A.C., et al., *Flow cytometric protein expression profiling as a systematic approach for developing disease-specific assays: identification of a chronic lymphocytic leukaemia-specific assay for use in rituximab-containing regimens. Leukemia*, 2006. 20(12): p. 2102-10.
 39. de Tute, R.M., *Flow cytometry and its use in the diagnosis and management of mature lymphoid malignancies. Histopathology*, 2011. 58(1): p. 90-105.
 40. Pott, C., et al., *Molecular remission is an independent predictor of clinical outcome in patients with mantle cell lymphoma after combined immunochemotherapy: a European MCL intergroup study. Blood*, 2008. 115(16): p. 3215-23.
 41. Pott, C., et al., *Quantitative assessment of molecular remission after high-dose therapy with autologous stem cell transplantation predicts long-term remission in mantle cell lymphoma. Blood*, 2006. 107(6): p. 2271-8.
 42. Ritgen, M., et al., *Quantitative MRD monitoring identifies distinct GVL response patterns after allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia: results from the GCLLSG CLL3X trial. Leukemia*, 2008. 22(7): p. 1377-86.
 43. Bottcher, S., et al., *Minimal Residual Disease Quantification Is an Independent Predictor of Progression-Free and Overall Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia: A Multivariate Analysis From the Randomized GCLLSG CLL8 Trial. J Clin Oncol*, 2012. 30(9): p. 980-8.
 44. Moreno, C., et al., *Clinical significance of minimal residual disease, as assessed by different techniques, after stem-cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia. Blood*, 2006. 117 (11): p. 4563-9.
 45. Moreton, P., et al., *Eradication of minimal residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukemia after alemtuzumab therapy is associated with prolonged survival. J Clin Oncol*, 2005. 23(13): p. 2971-9.
 46. Lamanna, N., et al., *Sequential therapy with fludarabine, high-dose cyclophosphamide, and rituximab in previously untreated patients with chronic*

- lymphocytic leukemia produces high-quality responses: molecular remissions predict for durable complete responses.* J Clin Oncol, 2009. 27(4): p. 491-7.
47. Geisler, C.H., et al., *Long-term progression-free survival of mantle cell lymphoma after intensive front-line immunochemotherapy with in vivo-purged stem cell rescue: a nonrandomized phase 2 multicenter study by the Nordic Lymphoma Group.* Blood, 2008. 112(7): p. 2687-93.
 48. Ferrer, A., et al., *Leukemic involvement is a common feature in mantle cell lymphoma.* Cancer, 2007. 109(12): p. 2473-80.
 49. D'Arena, G., et al., *Quantitative flow cytometry for the differential diagnosis of leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders.* Am J Hematol, 2000. 64(4): p. 275-81.
 50. Kluin-Nelemans, H.C. and J.K. Doorduijn, *Treatment of elderly patients with mantle cell lymphoma.* Semin Hematol, 2011. 48(3): p. 208-13.
 51. Barrena, S., et al., *Aberrant expression of tetraspanin molecules in B-cell chronic lymphoproliferative disorders and its correlation with normal B-cell maturation.* Leukemia, 2005. 19(8): p. 1376-83.
 52. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. 74(12): p. 5463-7.
 53. Gong, J.Z., et al., *Value of CD23 determination by flow cytometry in differentiating mantle cell lymphoma from chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma.* Am J Clin Pathol, 2001. 116(6): p. 893-7.
 54. Liu, Z., et al., *CD5- mantle cell lymphoma.* Am J Clin Pathol, 2002. 118(2): p. 216-24.
 55. Gaipa, G., et al., *Drug-induced immunophenotypic modulation in childhood ALL: implications for minimal residual disease detection.* Leukemia, 2005. 19(1): p. 49-56.
 56. Bottcher, S., et al., *Minimal residual disease detection in mantle cell lymphoma: methods and significance of four-color flow cytometry compared to consensus IGH-polymerase chain reaction at initial staging and for follow-up examinations.* Haematologica, 2008. 93(4): p. 551-9.
 57. Bottcher, S., et al., *Standardized MRD flow and ASO IGH RQ-PCR for MRD quantification in CLL patients after rituximab-containing immunochemotherapy: a comparative analysis.* Leukemia, 2009. 23(11): p. 2007-17.

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Dr. rer. nat. M. Kneba, Direktor der 2. Medizinischen Klinik für Innere Medizin im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, der mir den Arbeitsplatz im Labor für hämatologische Spezialdiagnostik zur Verfügung stellte und mir somit die Arbeit an diesem interessanten Thema ermöglichte.

Ganz besonders danken möchte ich außerdem Frau PD Dr. med. M. Brüggemann, Oberärztin des Labors für hämatologische Spezialdiagnostik der 2. Medizin und Herrn Dr. med. S. Böttcher, Oberarzt an der oben genannten Klinik, die mich als Betreuerin und Betreuer umfassend in das Thema einführten und mich während meiner gesamten Arbeit sorgfältig anleiteten und mich allzeit beratend unterstützten.

Ein weiterer besonderer Dank gilt auch Frau E. Harbst und Frau J. Hanani für die kompetente Anleitung in die Abläufe und Durchführung der Durchflusszytometrie sowie Frau PD Dr. med. C. Pott, Herrn Dr. rer. nat. H. Trautmann und Frau M. Bucher für die tatkräftige Unterstützung bei den Durchführungen der molekulargenetischen Analysen.

Danken möchte ich ebenso den Patienten, die an den Studien des Europäischen Mantelzell-Lymphom-Netzwerks und der Deutschen CLL-Studiengruppe teilgenommen haben.

Schließlich gilt mein herzlicher Dank meiner Familie, die mir den Raum für diese Arbeit geschaffen haben.

8. Lebenslauf

Name: Buske
 Vorname: Sebastian
 Geburtstag: 10.03.1980
 Geburtsort: Rendsburg
 Wohnort: Steinstr. 10, 24118 Kiel
 Eltern: Dr. Dietrich Buske, Facharzt für Nervenheilkunde
 Sylvie Buske, geb. Chalier, Sozialpädagogin
 Geschwister: Christopher Buske, Arzt
 Ausbildung: 1986-1990 Wilhelminen-Grundschule in Schleswig
 1990-1999 Domschulgymnasium in Schleswig, Abschluss
 Abitur
 1999-2000 Zivildienst beim Deutschen-Roten-Kreuz in
 Schleswig im Rettungsdienst
 2000-2007 Studium der Humanmedizin an der Christian-
 Albrechts-Universität zu Kiel, Abschluss: 3. Staatsexamen
 Beruflicher Werdegang: Seit Juni 2007 Assistenzarzt in der II. Medizinischen Klinik
 und Poliklinik des UK-SH, Campus Kiel

Veröffentlichungen zum Dissertationsthema als Co-Autor:

Minimal residual disease detection in mantle cell lymphoma: methods and significance of four-color flow cytometry compared to consensus IGH-polymerase chain reaction at initial staging and for follow- up examinations. Haematologica 2008 Apr; 93(4):551-559.